



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISABELA SIMÕES SOARES

**PROTEÍNA DE SEMENTE DE UVAIA (*Eugenia piryformis*): IMPACTO DO
ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO
EXTRATO**

CAMPINAS, SP

2024

ISABELA SIMÕES SOARES

**PROTEÍNA DE SEMENTE DE UVAIA (*Eugenia piryformis*): IMPACTO DO
ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO
EXTRATO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Alimentos e Nutrição

Orientador: Dr^a. Carolina Siqueira Franco Picone

Coorientador: Dr^a. Ana Carla Kawazoe Sato

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ISABELA
SIMÕES SOARES, E ORIENTADO PELA
PROFa. DR^a. CAROLINA SIQUEIRA
FRANCO PICONE E CO-ORIENTADO PELA
PROFa DR^a. ANA CARLA KAWAZOE SATO

CAMPINAS, SP

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Gardênia Garcia Benossi - CRB 8/8644

So11 Soares, Isabela Simões, 1996-
Proteína de semente de uvaia (*Eugenia pyriformis*) : impacto do ultrassom de alta intensidade nas propriedades funcionais do extrato / Isabela Simões Soares. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Carolina Siqueira Franco Picone.

Coorientador: Ana Carla Kawazoe Sato.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Uvaia - Semente. 2. Extração. 3. Proteína. 4. Ultrassom. 5. Lignina. I. Picone, Carolina Siqueira Franco, 1983-. II. Sato, Ana Carla Kawazoe, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Uvaia (*Eugenia pyriformis*) seed protein : impact of high intensity ultrasound on the functional properties of the extract

Palavras-chave em inglês:

Uvaia - Seed

Protein extraction

Proteins

Ultrasonics

Lignin

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Ana Carla Kawazoe Sato [Coorientador]

Aline Andreia Cavalari

Fabiana Perrechil Bonsanto

Data de defesa: 23-02-2024

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4128-7848>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6772222129062390>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Carla Kawazoe Sato

PRESIDENTE

Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP

Profa. Dra. Aline Andrea Cavalari

MEMBRO TITULAR

Universidade Federal de São Paulo, Diadema – SP

Profa. Dra. Fabiana Perrechil Bonsanto

MEMBRO TITULAR

Universidade Federal de São Paulo, Diadema – SP

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a minha orientadora, Professora *Carolina* pelo aprendizado, orientação, paciência e dedicação. Sua experiência e visão foram fundamentais para moldar e aprimorar este estudo.

A minha coorientadora, Professora *Ana Carla* pelo acompanhamento durante todo o projeto. Agradeço sua confiança e apoio.

Aos colegas do laboratório de microestruturas de alimentos (LMA), *Ana Clara, Carol, Isadora, Nathalia e Elvino*, pela troca de ideias e pelo ambiente colaborativo que enriqueceu minha experiência acadêmica.

Aos *meus pais* que sempre se empenharam para que a educação e formação acadêmica estivesse em primeiro lugar em minha vida. A minha *mãe* em especial que sempre foi e será minha referência, me ensinou a ser forte e encarar o mundo com coragem, determinação, humanidade, generosidade e amor. Às minhas irmãs *Gabriela e Juliana*, que me inspiram e que me ensinaram o que é cumplicidade, e que sempre estarão comigo. Ao meu companheiro *Allan*, pelo incentivo, motivação, inspiração e consolo.

Ao *Laboratório de Engenharia de Processos (LEP)* pelo aprendizado e colaboração. Ao *Laboratório Nacional de Biociências (LNBio)* e *Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM)*, disponibilizarem infraestrutura essenciais para a realização deste estudo. À *universidade pública* por tanto, por mudar a minha vida e a de muitos outros jovens.

Agradeço também à *banca examinadora*, por dedicarem seu tempo e expertise na avaliação deste trabalho.

Às agências de fomento *CNPq e Fapesp* (CNPq #164016/2022-8; FAPESP #2019/27354-3) pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o sucesso deste trabalho. Cada colaboração, conselho e incentivo foram fundamentais, e sou grata por ter compartilhado esta jornada com uma rede tão incrível de pessoas.

Muito Obrigada!

‘O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

O aumento por demanda de proteínas traz a necessidade da exploração de novas fontes proteicas. A utilização dos resíduos e subprodutos agrícolas é uma forma sustentável de mitigar a poluição ambiental, reduzir dos custos de descarte e transformá-los em produtos economicamente rentáveis. A Uvaia (*Eugenia pyriformis*) é uma fruta nativa do Brasil, cuja polpa vem sendo crescentemente utilizada para o desenvolvimento de produtos cosméticos e alimentícios, sendo suas sementes descartadas. As sementes de uvaia é uma matéria prima com alto potencial para a extração de compostos bioativos e proteínas para aplicação em formulação de diversos produtos. O ultrassom de alta intensidade é uma tecnologia sustentável que pode auxiliar na extração proteica e melhorar propriedades funcionais de proteínas pelo fenômeno de cavitação. Este trabalho teve como objetivo obter extratos proteicos da Farinha de Semente de Uvaia (FSU) por extração alcalina, sem ou com pré-tratamento de ultrassom, e avaliar o efeito da potência de ultrassom (250W e 450W) nas propriedades físico-química e tecnológicas dos extratos. Os extratos foram obtidos por solubilização alcalina em pH 11 e recuperação no pH de baixa solubilidade (pH 3). A extração precedida por sonicação a 250W resultou em maior teor proteico (32,21%), porém menor rendimento proteico (14,23%). O extrato obtido sem ultrassom apresentou menor pureza (29,75% de proteína), porém maior rendimento (15,66%). As sementes de uvaia possuem alto teor de compostos fenólicos (584,80 mg AG/g) e consequentemente alta capacidade antioxidante (404,15 μ M TE/g por ABTS e 3256,57 μ M Fe_2SO_4 / g por FRAP). A realização de uma pré-etaapa de extração fenólica anterior à extração proteica reduziu em até 90% o teor de fenólicos dos extratos em relação à farinha da semente, mesmo assim os extratos proteicos apresentaram considerável teor de fenólicos e boa capacidade antioxidante. A amostra tratada por ultrassom 250W apresentou maior diâmetro hidrodinâmico (236,2 nm), quando comparada ao controle (106,9 nm) e à amostra tratada com ultrassom 450W (191,70 nm). O peso molecular das frações proteicas foi avaliado por eletroforese em condições redutoras e não redutoras. A estrutura secundária predominante nas proteínas de semente de uvaia são β - Folhas, e a sonicação como pré-tratamento mostrou redução na composição dessas estruturas e aumentou estruturas β – Voltas. Quanto às propriedades funcionais os extratos proteicos

apresentaram solubilidade variando de 12 a 34% na faixa de pH de 2 a 11. De maneira geral, a sonicação reduziu a capacidade de retenção de água e óleo. A presença de sais e material lignocelulósico nos extratos pode ter influenciado a solubilidade dos mesmos bem como o potencial zeta em diferentes valores de pH. Por fim, foi possível obter extrato proteico de semente de uvaia, e o ultrassom mostrou auxiliar na obtenção de extratos mais puros. Este trabalho contribui para o conhecimento do potencial tecnológico do resíduo do processamento de uvaia.

Palavras-chave: Semente de uvaia, extração, proteína, ultrassom, lignina, propriedades funcionais.

ABSTRACT

The increasing demand for proteins highlights the needs for new protein sources. The use of agricultural residues and by-products is a sustainable way to mitigate environmental pollution, reduce disposal costs, and transform them into economically viable products. Uvaia (*Eugenia pyriformis*) is a Brazilian fruit which the pulp has been increasingly used for the development of cosmetic and food products, with its seeds being discarded. Uvaia seeds are a raw material with high potential for the extraction of bioactive compounds and proteins. High-intensity ultrasound is a sustainable technology that can assist in protein extraction and improve the functional properties of proteins through cavitation phenomena. This study aimed to obtain protein extracts from Uvaia Seed Flour (FSU) through alkaline extraction, with or without ultrasound pre-treatment, and evaluate the effect of ultrasound power (250W and 450W) on the physicochemical and technological properties of extracts. The extracts were obtained by alkaline solubilization at pH 11 and recovery at a low solubility pH (pH 3). Sonication-assisted extraction at 250W resulted in a higher protein content (32.21%) but a lower protein yield (14.23%). The extract obtained without ultrasound showed lower purity (29.75% protein) but higher yield (15.66%). Uvaia seeds have a high content of phenolic compounds (584.80 mg GAE/g) and, consequently, a high antioxidant capacity (404.15 μ M TE/g by ABTS and 3256.57 μ M Fe₂SO₄/g by FRAP). A pre-step of phenolic extraction before protein extraction reduced phenolic content by up to 90%, yet the protein extracts still exhibited a considerable phenolic content and good antioxidant capacity. The sample treated with 250W ultrasound showed a larger hydrodynamic diameter (236.2 nm) compared to the control treatment (106.9 nm) and the 450W ultrasound treatment (191.70 nm). The predominant secondary structure in Uvaia seed proteins is β -sheets, and sonication as a pre-treatment showed a reduction in the composition of these structures and an increase in β -turn structures. Regarding functional properties, protein extracts showed solubility ranging from 12 to 34% in the pH range of 2 to 11. Overall, sonication reduced water and oil retention capacity. The presence of salts and lignocellulosic materials on the extracts might be related to their low solubility and negative zeta potential throughout diverse pH range... In conclusion, it was possible to obtain Uvaia seed protein extracts, and the use of ultrasound prior to the extraction improved the purity of the obtained extracts. This study contributes to the understanding of the technological potential of Uvaia residues.

Keywords: Uvaia seed, extraction, protein, ultrasound, lignin, functional properties.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores que influenciam o processo de sonicação. Adaptado de Lamsal e Rahman (2021).	28
Tabela 2. Parâmetros e efeitos do tratamento ultrassônico na extração e modificação de proteínas de semente de frutas	30
Tabela 3. Composição centesimal da semente de uvaia	41
Tabela 4. Porcentagem de amido total, proteína bruta e rendimento proteico e de matéria seca dos extratos proteicos de semente de uvaia.....	43
Tabela 5. Fenólicos totais e atividade antioxidante da farinha de semente de uvaia e dos extratos proteicos	44
Tabela 6. Composição de estruturas secundárias das proteínas (porcentagem) nos extratos proteicos de semente de uvaia por dicroísmo circular na região UV (190-260 nm).	49
Tabela 7. Teor de cinzas em extratos proteicos de semente de uvaia	54
Tabela 8. Quantificação de açúcares solúveis em semente de uvaia.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Locais de ocorrência de uvaieira registrados no Brasil. Fonte: CARVALHO, 2010.	21
Figura 2. Aspectos gerais de <i>E. pyrifomis</i> . (A) Copa da árvore com frutos. (B) Ramos com frutos em fase de maturação. (C) Frutos de uvaia maduras. (D) Sementes. Campinas, SP, 2023. Fonte: Arquivo pessoal.	23
Figura 3. Formação de bolhas de cavitação por ondas sonoras emitidas por sonicador em um meio aquoso. Adaptado de Rahman e Lamsal (2021).	28
Figura 4. Diagrama de execução deste projeto. EPCT: Tratamento controle. EP250W: Tratamento de ultrassom 250W. EPCT450W: Tratamento de ultrassom 450W.	33
Figura 5. Distribuição do diâmetro médio de partícula da farinha de semente de uvaia utilizada para extração de proteínas.	41
Figura 6. Curva de solubilidade proteica na farinha de semente de uvaia na faixa de pH 2 a 12.	42
Figura 7. Potencial zeta da farinha de semente de uvaia e dos extratos proteicos de uvaia.	46
Figura 8. Diâmetro hidrodinâmico dos extratos proteicos de semente de uvaia em suspensão aquosa. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 5\%$).	47
Figura 9. Espectro de FTiR dos extratos proteicos de semente de uvaia.	49
Figura 10. Curva de solubilidade dos extratos proteicos de semente de uvaia, tratados ou não com ultrassom.	51
Figura 11. Capacidade de absorção de óleo e água dos extratos proteicos de semente de uvaia em grama de óleo ou água por grama de matéria seca (ms). As barras de erro representam os desvios padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.	52
Figura 12. Espectro UV-Vis dos extratos proteicos de semente de uvaia e lignina comercial.	54
Figura 13. Eletroforese em condições redutoras e não redutoras dos extratos proteicos de uvaia. (A) Amostras 2 mg/mL. (B) Amostras 5 mg/mL. 0= Padrão de peso molecular. 1= ECPT, 2= EPCT - Redutor, 3= EP250W, 4= EP250W – Redutor, 5= EP450W, 6= EP450W – Redutor.	67

Figura 14. Termograma de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) dos extratos proteicos de semente de uvaia.	69
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	Uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i>)	21
3.2	Proteínas de fontes vegetais.....	24
3.3	Propriedades funcionais de proteínas vegetais	25
3.4	Processos de extração de proteínas	26
3.4.1	Ultrassom	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Materiais.....	32
4.2	Métodos.....	32
4.3	Preparo das amostras.....	34
4.4	Caracterização e composição centesimal	34
4.5	Amido total	34
4.6	Fenólicos totais	35
4.7	Solubilidade proteica.....	35
4.8	Processo de extração.....	36
4.8.1	Extração fenólica	36
4.8.2	Tratamento de ultrassom.....	36
4.8.3	Extração alcalina e precipitação isoeletrica	36
4.9	Caracterização do extrato proteico de semente de uvaia	37
4.9.1	Rendimento.....	37
4.9.2	Potencial ζ (zeta)	37

4.9.3	Raio Hidrodinâmico	37
4.9.4	FT-iR	37
4.9.5	Dicroísmo circular	38
4.9.6	Varredura em espectro UV-Vis.....	38
4.10	Propriedades tecno funcionais do extrato proteico de semente de uvaia	
	38	
4.10.1	Solubilidade.....	38
4.10.2	Absorção de óleo e água	38
4.11	Atividade antioxidante do extrato proteico de semente de uvaia	39
4.11.1	ABTS	39
4.11.2	FRAP	39
5	ANÁLISE DE DADOS	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
6.1	Caracterização da semente de uvaia.....	40
6.2	Rendimento de extração	43
6.3	Fenólicos totais e atividade antioxidante.....	44
6.4	Potencial Zeta e Diâmetro hidrodinâmico.....	45
6.5	FTiR e dicroísmo circular.....	48
6.6	Propriedades funcionais	50
6.6.1	Solubilidade da proteína	50
6.6.2	Capacidade de absorção de óleo e água	51
6.7	Identificação de material lignocelulósico e quantificação de cinzas	53
7	CONCLUSÃO	56
8	TRABALHOS FUTUROS.....	57
9	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A – Resultados Complementares.....	65
1.	Quantificação de açúcares solúveis.....	66
2.	Eletroforese	67

3.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	69
----	---	----

1 INTRODUÇÃO

A gestão de subprodutos agroindustriais está se tornando uma preocupação mundial por questões ambientais. A utilização dos resíduos e subprodutos agrícolas é uma forma sustentável de mitigar os problemas de poluição ambiental, tratamento de resíduos e custos de descarte (CHEOK *et al.*, 2017; GADALKAR; RATHOD, 2020). Empregando técnicas adequadas é possível recuperar compostos bioativos, vitaminas, minerais, polissacarídeos e proteínas, por exemplo (PATRA; ABDULLAH; PRADHAN, 2022), tornando esses resíduos produtos economicamente rentáveis. A aplicação de compostos bioativos dos resíduos agroindustriais pode ser diversa, ser aplicados em produtos alimentícios, produtos farmacêuticos, cosméticos ou para geração de energia (biorrefinaria) (POJIĆ; MIŠAN; TIWARI, 2018).

Diversos estudos têm mostrado o papel promissor das proteínas vegetais como agentes ativos na estabilização de sistemas emulsionados e espumas (BISWAS; SIT, 2020; ESPINOSA-MURILLO *et al.*, 2021; XUE *et al.*, 2018). As técnico-funcionalidades das proteínas são definidas como propriedades físicas e químicas que afetam o comportamento das proteínas nos sistemas em que se encontram durante o processamento ou armazenamento (FEYZI *et al.*, 2017).

Dentre os resíduos agroindustriais promissores para extração de proteínas destacam-se as, sementes, cascas e bagaços que em alguns casos, podem chegar a até 50% do peso total do fruto (CALDERÓN-OLIVER; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2020). Estes subprodutos são geralmente perdidos ou subutilizados e apresentam grande potencial para a extração de compostos funcionais de alto valor agregado (ESPINOSA-MURILLO *et al.*, 2021; KUMORO; ALHANIF; WARDHANI, 2020).

Diante da crescente população mundial e consequentemente a demanda por proteínas há a necessidade da exploração de novas fontes proteicas (KORNET *et al.*, 2020). Além disso, a tendência crescente do veganismo e as preocupações éticas e com a sustentabilidade de produção de proteína de origem animal aumentou a demanda por proteínas vegetais alternativas (GANI *et al.*, 2022; YUSREE *et al.*, 2021). Proteínas vegetais com funcionalidades desejadas para atender aos requisitos de produção industrial, são urgentemente necessárias. Novas iniciativas são necessárias para aumentar a produção de proteínas de alta qualidade nutricional e propriedades funcionais de forma sustentável. Assim, o estudo de novas proteínas vegetais tem

atraído cada vez mais o interesse da academia e setor industrial (KUMAR *et al.*, 2021).

A Uvaia (*Eugenia pyriformis*) é uma fruta pertencente à família das Mirtaceas nativa da região Sul do Brasil, sabor ácido e adocicado, textura aveludada com uma fina casca, carnosa e coloração amarelo-alaranjado (CARVALHO, 2010). A uvaia possui de 1 a 3 sementes que corresponde a 16% da massa total do fruto (FARIAS *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021). As sementes possuem tegumento de cor castanho, cotilédones carnosos e justapostos (DACOREGGIO *et al.*, 2021; GUSTAVO SGANZERLA *et al.*, 2018; SCALON *et al.*, 2012). Geralmente os frutos de uvaia são consumidos *in natura* ou processados na forma de sucos, vinagres, cervejas, licores, geleias, compotas, iogurtes e sorvetes (FARIAS *et al.*, 2020), e as sementes são descartadas. O conhecimento do potencial nutritivo e tecnológico deste resíduo apresenta uma oportunidade de valorização do patrimônio genético nacional, podendo estimular o desenvolvimento da agricultura sustentável, preservação e exploração consciente da biodiversidade brasileira.

A produção de uvaia geralmente é feita por pequenos pomares e produções familiares. A comercialização da fruta *in natura* em larga escala é inviável devido a fragilidade da casca sofrer injúrias durante a colheita e transporte (CARVALHO, 2010), portanto se faz a comercialização dos frutos ou polpa congelada. Até o momento não há registro de dados do volume de produção de uvaia (“Embrapa bdpa”, 2023; “IBGE”, 2023).

Nos últimos anos houve um número crescente de produtos processados utilizando a polpa de uvaia (SGANZERLA; DA SILVA, 2022), incluindo grandes marcas produtoras de cervejas, sorvetes e cosméticos. O aumento do uso da polpa da fruta pela indústria traz a preocupação quanto aos resíduos gerados.

As sementes de uvaia é uma matéria prima com potencial para a extração de compostos bioativos e para aplicação em formulação de alimentos funcionais para as indústrias alimentícias e farmacêuticas (DA SILVA *et al.*, 2022). Os poucos estudos que envolvem a semente de uvaia apresentam a extração de compostos antioxidantes que são abundantes tanto na polpa quanto na semente, ou estudos de parâmetros agrônômicos (RODRIGUES *et al.*, 2021; SGANZERLA; DA SILVA, 2022).

As caracterizações centesimais da semente de uvaia indicam altos níveis de proteína (12% aproximadamente), porém ainda não há estudos que explorem sua extração, caracterização e aplicação. A semente de uvaia apresenta maior teor

proteico do que outras sementes de frutas da mesma família, como a goiaba (7,6%) e pitanga (10%) (LIMA *et al.*, 2014; RAIHANA *et al.*, 2015).

A quantidade e características de proteínas em resíduos de frutas são altamente variáveis, mas as sementes de frutas em geral apresentam maior teor de proteínas em relação à polpa, bagaços e pedúnculos (OLIVARES-GALVÁN; MARINA; GARCÍA, 2020). Diversos estudos foram feitos sobre composição nutricional e funcional de proteína de sementes de frutas como a goiaba, maracujá, melancia, melão, jaca, tamarindo, marmelo, entre outras (BISWAS; SIT, 2020; ESPINOSA-MURILLO *et al.*, 2021; GADALKAR; RATHOD, 2020; GONZÁLEZ-GARCÍA; MARINA; GARCÍA, 2014; LIU *et al.*, 2018; NICANOR *et al.*, 2001; ULLOA *et al.*, 2017) porém não há estudos sobre a extração de proteína da Uvaia.

O processo de extração de proteínas vegetais requer a quebra de tecidos, membranas e paredes celulares para liberação material intracelular. Para materiais vegetais o processo é comumente realizado por moagem prévia à extração alcalina (CUI *et al.*, 2017), onde ocorre a solubilização das proteínas devido à ionização de aminoácidos ácidos e neutros em pH elevado, seguida da precipitação das proteínas no ponto isoelétrico. Essa técnica tem apresentado bons rendimentos de proteína aliados a baixo custo de produção (POJIĆ; MIŠAN; TIWARI, 2018). Os rendimentos de extração podem ainda ser intensificados pelo uso de tecnologias auxiliares como a tecnologia de ultrassonicação.

O uso do ultrassom de alta intensidade na extração proteica pode resultar em maior rendimento de extração devido a abertura da matriz vegetal e liberação das proteínas de forma mais eficiente do que os métodos convencionais de extração. No entanto, a depender das condições empregadas, a técnica pode ocasionar alterações conformacionais nas proteínas e alterações de suas funcionalidades (FLORES-JIMÉNEZ *et al.*, 2019; RAHMAN; LAMSAL, 2021).

O ultrassom de alta intensidade pode alterar a funcionalidade das proteínas, pois suas ondas sonoras em um meio líquido geraram ondas mecânicas e cisalhamento hidrodinâmico (AKHARUME; ALUKO; ADEDEJI, 2021) levando à formação e explosão de pequenas bolhas, fenômeno denominado cavitação. O processo de cavitação resulta em alterações das propriedades físico-químicas e estruturas e funcionais das proteínas sem uso de aditivos orgânicos ou excesso de calor (FLORES-JIMÉNEZ *et al.*, 2019).

O efeito de cavitação do ultrassom pode aumentar a área de superfície de partículas, alterar as estruturas quaternárias, terciárias e secundárias de proteínas, pelo rompimento de ligações de hidrogênio, interações eletroestáticas e hidrofóbicas, que consequentemente influenciará nas modificações de propriedades funcionais das proteínas, como alterações na sua solubilidade, propriedades interfaciais e de atividade enzimática ou alergênica (TAN; NAWAZ; BUCKOW, 2023) a depender de sua fonte.

Diante do apresentado, estudos que explorem a extração da proteína de semente de Uvaia e avaliação de suas propriedades funcionais e nutricionais a partir de tecnologias sustentáveis são de grande importância para valorização da cadeia produtiva da fruta e exploração sustentável da flora brasileira.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Obter extratos proteicos de semente de uvaia (*Eugenia pyriformis*) por extração alcalina, sem ou com pré-tratamento de ultrassom, e avaliar o efeito da potência de ultrassom nas estruturas físico-química, propriedades funcionais dos extratos.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extrato proteico de semente de uvaia por precipitação isoelétrica, com ou sem pré-tratamento de ultrassom de alta intensidade;
- Avaliar o efeito do ultrassom no rendimento de extração proteica de semente de uvaia;
- Avaliar a influência da potência do ultrassom nas estruturas químicas e física na proteína de semente de uvaia;
- Avaliar as funcionalidades dos extratos proteicos de semente de uvaia quanto a sua solubilidade e absorção de óleo e água;
- Avaliar a influência da potência de ultrassom nas propriedades de solubilidade e capacidade de absorção de água e óleo dos extratos proteico de semente de uvaia;
- Avaliar influência do processo de extração das proteínas na atividade antioxidante dos extratos proteicos obtidos.
- Avaliar o tamanho molecular das proteínas de semente de uvaia por eletroforese
- Avaliar o efeito do ultrassom nas propriedades térmicas do extrato proteico de semente de uvaia.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Uvaia (*Eugenia pyriformis*)

A uvaia (*Eugenia pyriformis*) é uma fruta nativa do Brasil, encontrada em região de Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal, já foi registrada sua ocorrência nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e todos os estados da Região Sul Brasileira (Figura 1) (CARVALHO, 2010).

A classificação botânica da espécie apresenta a seguinte hierarquia segundo The Angiosperm Phylogeny Group (2009):

Divisão *Angiospermae*

Clado *Rosidae*

Ordem *Myrtales*

Família *Myrtaceae*

Gênero *Eugenia*

Espécie *Eugenia pyriformis*.

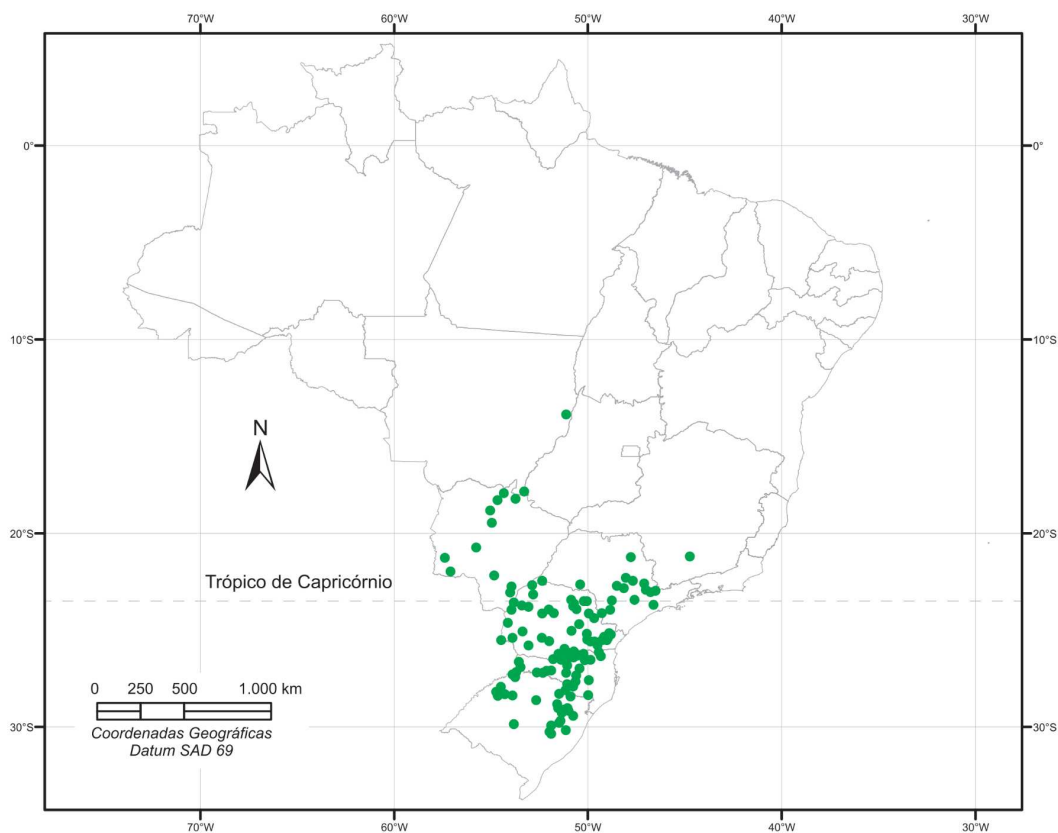


Figura 1. Locais de ocorrência de uvaieira registrados no Brasil. Fonte: CARVALHO, 2010.

A Figura 2 mostra os aspectos gerais da árvore, frutos e semente de uvaia. A árvore que produz a uvaia é perene e pode alcançar alturas consideráveis, com folhas coriáceas e opostas de coloração verde brilhante. A floração ocorre entre os meses de agosto a fevereiro a depender na região de produção (CARVALHO, 2010). Suas flores, agrupadas em inflorescências, são pequenas e brancas (JACOMINO et al., 2018).

Os frutos da uvaia são bagas globosas ou piriformes, apresentando uma casca fina e polpa suculenta. Quando maduros, esses frutos exibem uma variação de cores que vai do amarelo ao alaranjado (DA SILVA et al., 2019; SGANZERLA et al., 2019). O sabor único da uvaia combina acidez e doçura. A produção média de frutos por árvore é de 5kg, podendo chegar a 10kg se adubada (CARVALHO, 2010).

Além de ser consumida in natura, a uvaia é utilizada para a produção de sucos, geleias, compotas, licores, cervejas e sorvetes. Seu valor nutricional inclui uma boa quantidade de vitamina C, vitamina A, fósforo e cálcio, juntamente com compostos antioxidantes benéficos para a saúde (DA SILVA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2021). Até o momento não há dados técnicos a respeito da produção e consumo dos frutos de uvaia pela indústria (consulta feita em base de dados da pesquisa agropecuária EMBRAPA (“Embrapa bdpa”, 2023)).

Os frutos possuem de 1 a 4 sementes que corresponde a 16% da massa total do fruto (FARIAS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2021). As sementes possuem tegumento de cor castanho, cotilédones carnosos e justapostos (DACOREGGIO et al., 2021; GUSTAVO SGANZERLA et al., 2018). As sementes de uvaia são recalcitrantes, e não resistem a dessecação para posterior germinação, perdendo assim a sua viabilidade. A propagação de novas mudas geralmente ocorre por meio de sementes, embora a enxertia seja empregada para preservar características desejáveis (SCALON et al., 2012). Além de seu valor econômico e culinário, a uvaia desempenha um papel ecológico importante, contribuindo para a biodiversidade em seu habitat natural. A Uvaieira é recomendada para plantio paisagístico e ambiental sobretudo ao longo de rios e reservatórios, em área com inundação periódica, a fim de atrair, a fauna que se alimentam dos seus frutos (CARVALHO, 2010).

Nos últimos anos houve um número crescente de produtos processados utilizando a polpa de uvaia e de estudos relativos à fruta (SGANZERLA; DA SILVA, 2022). A produção de uvaia geralmente é feita por pequenos pomares e produções familiares. A comercialização da fruta in natura em larga escala é inviável devido a

fragilidade da casca a propensão a sofrer injúrias durante a colheita e transporte (CARVALHO, 2010), portanto se faz a comercialização dos frutos ou polpa congelada. Até o momento não há registro de dados do volume de produção de uvaia (“Embrapa bdpa”, 2023; “IBGE”, 2023).



Figura 2. Aspectos gerais de *E. pyriformis*. (A) Copa da árvore com frutos. (B) Ramos com frutos em fase de maturação. (C) Frutos de uvaia maduras e corte longitudinal da fruta. (D) Sementes. Campinas, SP, 2023. Fonte: Arquivo pessoal (A, B e D) Google imagens: Uvaia (C).

As sementes de uvaia é uma matéria prima com alto potencial para a extração de compostos bioativos e para aplicação em formulação de alimentos funcionais para as indústrias alimentícias e farmacêuticas (DA SILVA et al., 2022).

Farias e colaboradores (2020) identificaram maior teor de compostos fenólicos e flavonoides nas sementes (237,44 mg GAE g⁻¹ e 101,46 mg CE g⁻¹ respectivamente)

do que na polpa (49,36 mg GAE g⁻¹ e 6,49 46 mg CE g⁻¹) (FARIAS et al., 2020). A semente de uvaia apresenta cerca de 12% de proteína (FARIAS et al., 2020), porém ainda não há estudos que explorem sua extração, caracterização e aplicação. Os poucos estudos que envolvem a semente de uvaia apresentam extração de compostos antioxidantes que são abundantes tanto na polpa quanto na semente, ou estudos de parâmetros agrônômicos (RODRIGUES et al., 2021; SGANZERLA; DA SILVA, 2022).

3.2 Proteínas de fontes vegetais

As proteínas desempenham diferentes funções em sistemas biológicos, que pode ser estrutural, transporte, de reserva e outros. Suas estruturas são formadas por sequências de aminoácidos ligados por ligações peptídicas que podem se reorganizar tridimensionalmente em estruturas, secundárias, terciárias e quaternárias, por interações hidrofóbicas, eletrostáticas, pontes de hidrogênio e ligações covalentes (WATFORD; WU, 2018).

O consumo de proteínas vegetais vem ganhando espaço devido à demanda em atender o mercado de consumidores preocupados com o bem-estar animal, problemas ambientais e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CHANDRAN; SURI; CHOUDHARY, 2023). As proteínas vegetais são biodegradáveis, possuem potencial de baixo custo de exploração, como a possibilidade de explorar subprodutos vegetais, e podem apresentar propriedades tecnológicas vantajosas, tornando-as atrativas para diversas aplicações na indústria de alimentos. (LOVEDAY, 2019).

Em termos gerais, com base em sua estrutura, as proteínas podem ser classificadas como globulares, fibrosas, ou flexíveis dependendo de sua composição aminoacídica, o que irá definir também suas propriedades físico-químicas, (CHANDRAN; SURI; CHOUDHARY, 2023). As proteínas vegetais são compostas principalmente de proteínas globulares, que são classificadas como albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas diluídas), prolaminas (solúveis em soluções aquosas de etanol) e glutelinas (solúveis em soluções ácidas/alcalinas diluídas ou insolúveis em água) (LOVEDAY, 2019; SIM et al., 2021).

As proteínas globulares são compostas de estruturas densamente compactas devido a efeitos hidrofóbicos, ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de

van der Waals e ligações dissulfeto (LAKEMOND et al., 2000), o que podem afetar sua solubilidade.

Proteínas vegetais provenientes de cereais, leguminosas, oleaginosas são bastante exploradas, possuem sua composição e funcionalidades bem definidas (LOVEDAY, 2019), porém outras fontes vegetais podem ser promissoras para extração de proteínas, como folhas, cascas e sementes de frutas.

As proteínas de semente de frutas são compostas majoritariamente por proteínas de reserva sendo essas também presentes em diferentes composições em cereais e leguminosas (ASHOK N.; SONTAKKE, 2023). A composição proteica e suas frações podem variar dependendo da semente. Estudos da literatura indicam que a fração proteica mais frequente em sementes são as glutelinas.

Estudo com semente de maracujá encontrou composição proteica de 12% sendo 95% glutelinas (ESPINOSA-MURILLO et al., 2021). Em sementes de jaca com composição proteica de 14% foi identificado que a maior fração (65%) correspondem a glutelinas, seguido de albumina (16%) (ULLOA et al., 2017). Para sementes de goiaba glutelinas foi identificada como maior fração proteica com 86% (BERNARDINO-NICANOR et al., 2006). Cada uma dessas frações possui diferentes funcionalidades tecnológicas que afetam o desempenho geral do ingrediente proteico com base em suas proporções (SIM et al., 2021).

3.3 Propriedades funcionais de proteínas vegetais

Os ingredientes à base de proteínas cumprem muitas funções tecnológicas diferentes em alimentos, que incluem cor, textura, sabor, suculência, dentro outras características. As propriedades funcionais das proteínas são definidas como propriedades físicas e químicas que afetam o comportamento das proteínas nos sistemas em que se encontram durante o processamento ou armazenamento (FEYZI et al., 2017).

As principais propriedades funcionais das proteínas para aplicações alimentícias incluem solubilidade, gelificação, formação de espuma, emulsificação, retenção de água e óleo (SIM et al., 2021; TAN; NAWAZ; BUCKOW, 2023). Alguns fatores que influenciam as propriedades funcionais de proteínas vegetais incluem: diferenças no peso molecular, flexibilidade molecular, a presença de regiões hidrofóbicas, cargas na superfície da proteína e associação e dissociação de outros

compostos, como a interação com polissacarídeos e compostos fenólicos (CZUBINSKI; DWIECKI, 2017; SIM et al., 2021).

No geral, proteínas vegetais apresentam baixa solubilidade em água em pH neutro (próximo ao ponto isoeletrico), e melhor solubilidade em pH mais ácido ou alcalino. As proteínas globulares atuam como bons agentes emulsionantes e espumantes devido às regiões apolares em suas superfícies que promovem a adsorção nas interfaces óleo-água ou ar-água (TAN; NAWAZ; BUCKOW, 2023).

Proteínas globulares também podem apresentar boa formação de gel, pois quando passam por processamento térmico se desdobram, expondo grupos apolares e sulfidrilas à fase aquosa circundante, causando agregação via formação de ligações hidrofóbicas e pontes dissulfeto (SIM et al., 2021). A formação do gel ocorre pela reorganização estrutural das proteínas em uma matriz ordenada em equilíbrio de interações proteína-proteína e proteína-solvente, que são mantidas por um equilíbrio de forças de atração e repulsão (URUAKPA, 2012).

A fração proteica de glutelinas extraídas de semente de goiaba apresentaram boa capacidade de absorção de água, boa solubilidade em valores de pH ácido e alcalino e boas propriedades espumantes e emulsificantes; sugerindo ser um ingrediente adequado em formulações alimentícias (BERNARDINO-NICANOR et al., 2006).

Estudos com proteínas de semente de fruta indicam que a modificação estrutural da proteína através de tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos, pré, durante ou pós extração proteica, podem melhorar a performance de suas propriedades funcionais (BEHERE; PATIL; RATHOD, 2021; BERNARDINO-NICANOR et al., 2006; ESPINOSA-MURILLO et al., 2021; NAIK et al., 2022).

3.4 Processos de extração de proteínas

A extração de proteínas vegetais requer a quebra de tecidos, membranas e paredes celulares para liberação material intracelular. Para materiais vegetais é comumente utilizado métodos de solubilização alcalina (pH 8-11) (CUI et al., 2017). O método alcalino de extração de proteínas envolve um meio líquido com pH distante do ponto isoeletrico para aumentar a solubilidade da proteína devido à ionização de aminoácidos ácidos e neutros em pH alto, seguida da recuperação por precipitação

em meio com o pH próximo ao ponto isoeletrico (valor de pH onde as proteínas possuem carga nula) (POJIĆ; MIŠAN; TIWARI, 2018).

Muitos métodos de pré-tratamento químico, físico e/ou enzimático têm sido estudados para aumentar o rendimento de extração de proteínas vegetais e promover modificações estruturais para melhoria de suas propriedades tecnológicas. Enzimas podem ser utilizadas para aumentar a digestibilidade de carboidratos de parede celular e auxiliar na extração e aumento de rendimento de proteínas. Metodologias como aquecimento por micro-ondas, emprego de fluidos supercríticos, ultrassom, campo elétrico pulsado e processamento à alta pressão do substrato, têm sido amplamente estudadas como pré-tratamento para aumentar o rendimento de extração e intensificar as funcionalidades de proteínas vegetais (BEHERE; PATIL; RATHOD, 2021; BYANJU et al., 2020; ESPINOSA-MURILLO et al., 2021; LOVEDAY, 2019; WEN et al., 2021)

3.4.1 Ultrassom

Entre as tecnologias emergentes de extração, uma alternativa atraente e ecológica para auxiliar na extração e modificação de proteínas vegetais é o ultrassom (THALÍA FLORES-JIMÉNEZ et al., 2022). O ultrassom consiste em ondas sonoras com frequências superiores à 16 kHz, acima do limite da audição humana. A energia dissipada pela onda é a combinação de frequência e potência, ela é usada para a categorização da técnica em: Ultrassom de alta intensidade (16 a 100 kHz, potência de 10 a 1.000 W/cm²), e ultrassom de baixa intensidade (100 kHz a 1 MHz, potência < 1W/cm²) (ALBAKRY et al., 2022; AMPOFO; NGADI, 2022; ESPINOSA-MURILLO et al., 2021; THALÍA FLORES-JIMÉNEZ et al., 2022; WANG et al., 2020).

O Ultrassom pode ser usado na indústria de alimentos tanto para monitorar as propriedades dos alimentos quanto para alterar suas propriedades (ZHU et al., 2018). O ultrassom de baixa intensidade é normalmente utilizado em instrumentos analíticos, já o de alta intensidade pode alterar a funcionalidade das proteínas, pois suas ondas sonoras em um meio líquido geram ondas mecânicas e cisalhamento hidrodinâmico (AKHARUME; ALUKO; ADEDEJI, 2021), levando à formação e implosão de pequenas bolhas, fenômeno denominado cavitação (Figura 3). O processo de cavitação é exotérmico e de alta energia que resulta em alterações das propriedades físico-químicas e estruturas e funcionais das proteínas sem uso de aditivos orgânicos ou excesso de calor (FLORES-JIMÉNEZ et al., 2019).

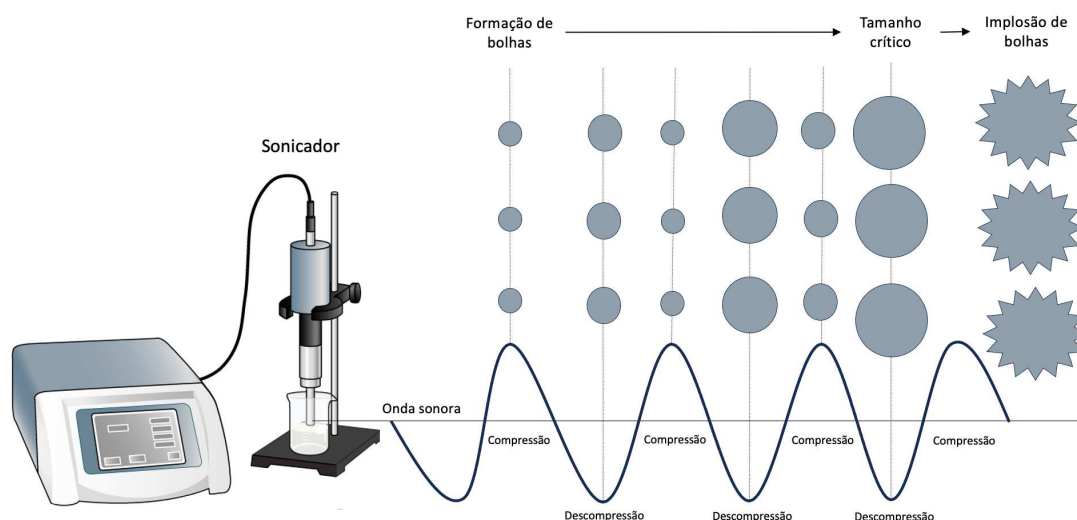


Figura 3. Formação de bolhas de cavitação por ondas sonoras emitidas por sonificador em um meio aquoso. Adaptado de Rahman e Lamsal (2021).

Os fatores que influenciam a eficiência do processo de ultrassom podem ser diversos, como observado na Tabela 1. Os parâmetros de processo como por exemplo, energia, frequência, intensidade, densidade de potência, tamanho e formato do recipiente de amostra e posição da ponteira submersa na amostra, interferem na cavitação resultante e, portanto, à extração e modificações do produto (RAHMAN; LAMSAL, 2021).

Tabela 1. Fatores que influenciam o processo de sonicação. Adaptado de Lamsal e Rahman (2021).

Parâmetros relacionados ao processo	Parâmetros relacionados à amostra
Intensidade (W/cm^2) e Densidade de energia (W/ml)	Tipo de proteína / Substrato
Posição da ponteira de ultrassom no meio	Composição da matriz
Tempo de tratamento	Tamanho de partícula
Aumento da temperatura	Proporção solvente:soluto
Tamanho e formato da ponteira de sonicação e do recipiente	

O uso do ultrassom de alta intensidade na extração proteica pode resultar em maior rendimento de extração devido à ação mecânica do ultrassom auxiliar na liberação das proteínas da matriz vegetal de forma mais eficiente do que os métodos

convencionais de extração. O ultrassom de alta intensidade é considerado um método suave de extração, que evita o uso de solventes agressivos ou altas temperaturas. No entanto, é importante mencionar que a otimização dos parâmetros do processo de sonicação, como potência, tempo de exposição e relação sólido-líquido, é essencial para obter os melhores resultados de extração (KAMAL et al., 2023). Além disso, cada tipo de material vegetal pode exigir ajustes específicos nos parâmetros de processo para maximizar o rendimento e a qualidade das proteínas extraídas, como observado na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros e efeitos do tratamento ultrassônico na extração e modificação de proteínas de semente de frutas

Fonte vegetal	Configuração de ultrassom	Etapas de aplicação do ultrassom	Método de extração	Resultados do efeito de cavitação	Referência
Semente de Maracujá	Tipo: Banho Frequência: 40kHz Potência: 1W Tempo: 15 e 30 min	Após extração proteica	Solvente: água Proporção: 1:20 (m/v) Álcali NaOH 1M pH 11	Aumentou a densidade aparente em 13,3% e a formação de estrutura mais porosa. A solubilidade proteica aumentou em média 5,21 e 9,86%. As propriedades de formação de espuma foram influenciadas pelo pH e pelo tempo de sonicação, atingindo até 577%, enquanto a concentração mínima de gelificação foi reduzida de 4 para 2% em pH 7.	(ESPINOSA-MURILLO et al., 2021)
Semente de Jaca	Tipo: sonda de titânio de 2,54 cm Frequência: 20kHz Potência: 200, 400 e 600W Tempo: 15 minutos	Após extração proteica	Solvente: água Proporção: 1:20 (m/v) Álcali NaOH 1M pH 12	Ultrassom em 200 W e 400 W melhorou a capacidade de retenção de óleo e a capacidade emulsificante, a atividade emulsificante e a estabilidade da emulsão aumentaram em 400 W e 600 W. A formação de espuma a capacidade de retenção de água (FC) aumentou após todos os tratamentos, em oposição à capacidade de retenção de água (WHC), menor concentração de gelificação e estabilidade de formação de espuma, que diminuíram, exceto em pH 4 para formação de espuma.	(RESENDIZ-VAZQUEZ et al., 2017)
Semente de melão	Tipo: Sonda Potência: 300, 375 e 450W	Durante extração	Solvente: NaOH 1M pH 9	Aumento do rendimento de 23,79% em 300W, 31,05% em 375W e 28,93% em 450W. Melhoria na capacidade de retenção de água, solubilidade,	(NAIK et al., 2022)

	Tempo: 2,50, 5 7,50, 10, 12,50, 15, 17,50 e 20 min				capacidade de formação e estabilidade da emulsão, menor capacidade de gelificação em comparação com a proteína de semente de melão extraída convencionalmente. Observou-se mudanças características na estrutura secundária da proteína	
Semente de Ameixa	Tipo: Sonda 0,636 cm de diâmetro Frequência: 20 kHz Potência: 200, 400 e 600W Tempo: 20 min	Após extração proteica	Solvente: Água Proporção: 1:12 (m/v) Álcali pH 8,5		Melhorou a capacidade de retenção de água, solubilidade, propriedades emulsificantes e capacidade de formação de espuma. O gel apresentou maior resistência em comparação com a proteína não tratada. O filme apresentou maior resistência à tração, menor alongamento e permeabilidade, microestrutura mais densa e compacta em comparação com a proteína não tratada	(XUE et al., 2018)
Semente de Guamuchil	Tipo: Sonda 2,54 cm de diâmetro Frequência: 20 kHz Potência: 200, 400 e 600W Tempo: 15 e 30 min	Após extração proteica	Solvente: Água Proporção: 1:20 (m/v) Álcali pH 12		Modificou as estruturas proteicas secundárias e terciárias da proteína, aumentou a hidrofobicidade superficial, flexibilidade molecular e a digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas em até 114,8%, 57,3% e 12,5%, respectivamente. Reduziu 11,9% o tamanho das partículas. As alterações estruturais e físico-químicas ocasionaram melhoria de até 115,5% na solubilidade, 39,8% na capacidade de absorção de óleo, enquanto os aumentos nas propriedades emulsionantes, espumantes, gelificantes foram de 87,4%, 74,2%, 40,0%, e 44,4 % respectivamente.	(THALÍA FLORES-JIMÉNEZ et al., 2022)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os frutos de Uvaia foram adquiridos da Empresa Sítio do Bello, localizado na Cidade de Paraibuna – SP produção da safra de 2021. Kit para determinação de amido total K-TSTA Megazymes®, óleo de girassol BUNGE® e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Métodos

O diagrama apresentado na Figura 4 mostra as etapas de desenvolvimento e avaliações realizadas neste trabalho. Inicialmente as sementes de uvaia foram liofilizadas e moídas, para se obter a farinha de semente de uvaia (FSU). As caracterizações químicas realizadas na FSU foram de composição centesimal, que incluem umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos (por diferença dos demais componentes). Foi quantificada a porcentagem de amido total, o teor de fenólicos, capacidade antioxidante e avaliada a distribuição granulométrica da farinha. O teor e as frações de açúcares solúveis são apresentados no Apêndice A.

Uma etapa prévia de extração de fenólicos com etanol 80% (v/v) foi incluída antes da etapa de tratamento de ultrassom e extração proteica, com o intuito de aumentar o rendimento proteico do extrato. Em seguida o resíduo da extração fenólica foi ressuspenso em água e tratado em duas condições de potência ultrassônica (250W e 450W), sendo EP250W a amostra sonicada a 250W de potência e EP450W a amostras sonicada a 450W de potência. Uma amostra controle (sem tratamento de ultrassom) também foi avaliada, nomeada EPCT. Em seguida todas as amostras tiveram pH ajustado para 11, para solubilização proteica. O sobrenadante desta solução foi recuperado e tiveram as proteínas precipitadas em pH 3,0. Os extratos proteicos foram liofilizados e avaliados quanto ao rendimento proteico, teor de fenólicos e atividade antioxidante.

As propriedades físico-químicas dos extratos foram avaliadas quanto ao potencial zeta, raio hidrodinâmico, modificações estruturais na proteína por dicroísmo circular, espectro químico feito por espectroscopia eletrônica de infravermelho por transformada de Fourier. O peso molecular das frações proteicas foi avaliado por eletroforese em gel de acrilamida em condições redutoras e não redutoras e as propriedades térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC), os resultados

destas análises são apresentados no Apêndice A. Também foi avaliada a solubilidade e capacidade de absorção de óleo e água dos extratos. Com os resultados obtidos, sentiu-se a necessidade de identificação da presença de material lignocelulósico nos extratos proteicos por espectroscopia UV e determinação do conteúdo de cinzas.

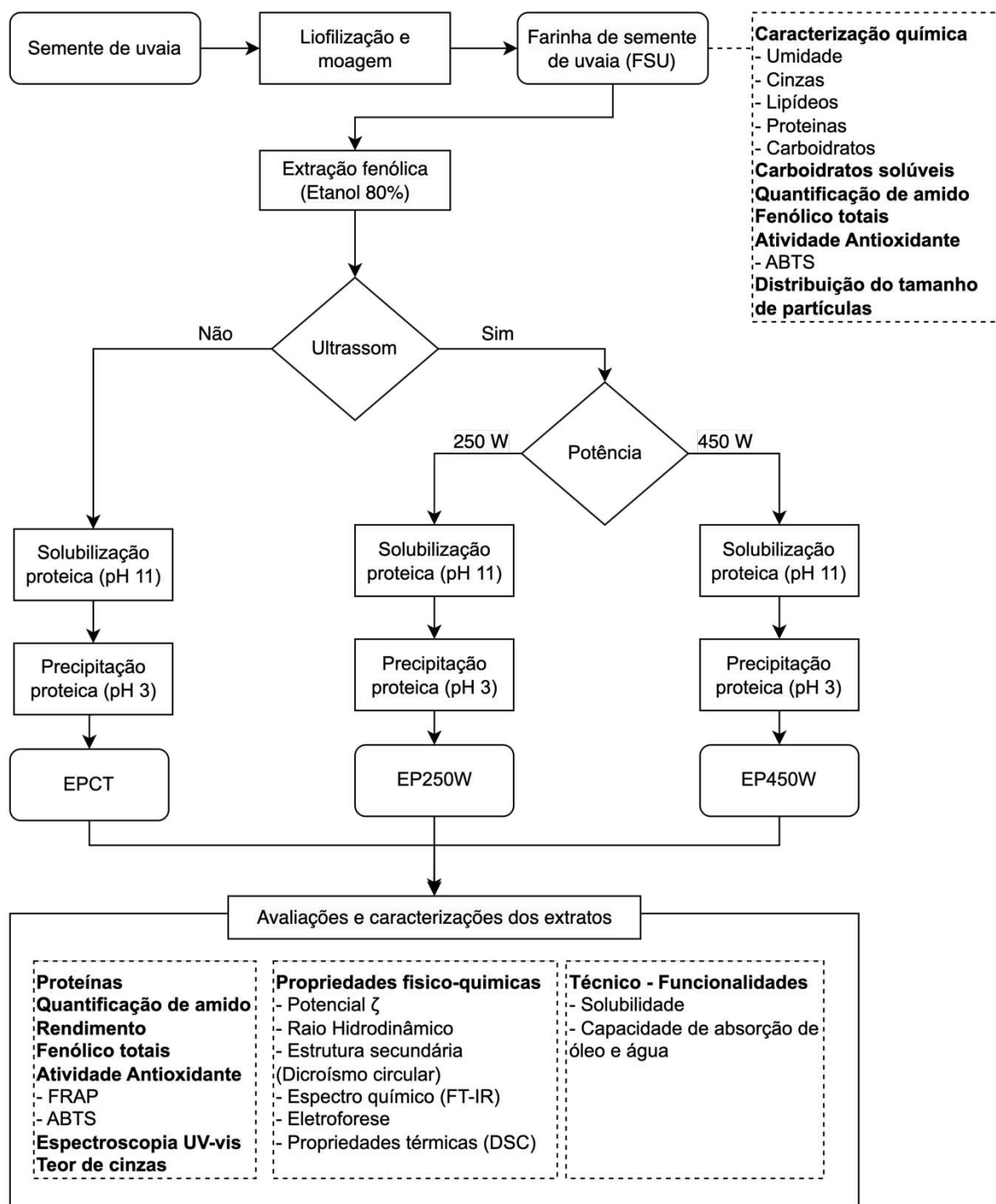


Figura 4. Diagrama de execução deste projeto. EPCT: Tratamento controle. EP250W: Tratamento de ultrassom 250W. EPCT450W: Tratamento de ultrassom 450W.

4.3 Preparo das amostras

Os frutos foram higienizados e despulpados manualmente. As sementes foram liofilizadas, em seguida processadas em liquidificador e armazenadas em sacos plástico em dessecadores até o momento do processamento.

4.4 Caracterização e composição centesimal

A distribuição do tamanho de partículas da farinha de semente de uvaia foi avaliada por difração a *laser* em um Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido) no compartimento de dispersão de pó seco Sirocco. Os resultados foram avaliados em relação à porcentagem de volume vs diâmetro médio (μm), foram calculadas as modas dos picos.

Para determinação de composição centesimal, que incluem umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos, foram empregados métodos da AOAC (ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2016). Sucintamente, a umidade foi determinada com a secagem das amostras até massa constante em estufa a 105 °C, as cinzas determinadas em mufla a 550 °C por gravimetria. A proteína foi determinada pela quantificação de nitrogênio total por Kjeldahl, utilizando fator de conversão de 6,25. O teor de lipídeos foi determinado utilizando clorofórmio e metanol como solventes de extração e quantificado por gravimetria (BLIGH; DYER, 1959). Os carboidratos foram determinados através da diferença entre o total de lipídeos, cinzas, proteínas e umidade.

4.5 Amido total

Para determinação de amido total na semente de uvaia e nos extratos proteicos, foi utilizado o kit para determinação de amido total K-TSTA Megazymes®. Em 100 mg de amostra, foi adicionado 2 mL de NaOH 1,7 M e mantido em agitação por 20 min em banho de gelo. Em seguida, 8 mL do tampão de acetato de sódio (1,0 M, pH 3,8) contendo cloreto de cálcio (5 mM) foi adicionado a cada tubo sob agitação. A hidrólise do amido ocorreu pela adição de 0,1 mL de amiloglucosidase (3.300 U/ml) em banho-maria a 50°C por 30 minutos.

As soluções de hidrólise de amido foram centrifugadas a 8.000 g por 5 min. Alíquotas 0,1 ml do sobrenadante foram transferidas para tubos de ensaio, e 3,0 ml

de reagente GOPOD foram adicionados. Os tubos foram incubados a 50°C por 20 min. Uma solução controle (branco) foi preparada misturando 0,1 ml de ácido acético 100 mM (pH 4,5) com 3,0 ml de reagente GOPOD. A absorbância de cada solução foi medida a 510 nm (MCCLEARY et al., 2020). O conteúdo total de amido foi calculado como mostrado na equação (1)

$$\% \text{ amido total} = \Delta A \cdot F \cdot \frac{EV}{W} \cdot 0,9 \quad (1)$$

onde ΔA = diferença entre a absorbância da solução da amostra em relação ao controle (branco), F = fator de conversão de absorbância em μg de glicose (93,94), EV = volume da amostra, W = peso da amostra em mg, 0,9 = fator para conversão de D-glicose livre para D-glicose anidra.

4.6 Fenólicos totais

Para quantificação de fenólicos totais, as amostras foram suspendidas em água 1% (m/v), em seguida 250 μL de solução de extrato fenólico ou padrão foram adicionados com 2,75 mL de Folin-Ciocalteu 3%, agitados em vórtex e mantido em repouso por 5 minutos. Adicionou-se 250 μL de Na_2CO_3 10% e incubou-se por 60 min 25 °C. As absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (Bel Engennier Photonic UV M-51 - Italia) a 765 nm. A quantificação de fenólicos totais nas amostras foi realizada utilizando uma curva padrão preparada com ácido gálico e os valores foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE). g^{-1} massa seca (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

4.7 Solubilidade proteica

Um estudo de solubilidade proteica na farinha de semente de uvaia (FSU) foi realizado para determinar o pH de maior e menor solubilidade utilizando o método de Bradford. As dispersões de farinha de semente de uvaia e água deionizada (1% m/v) foram mantidas em agitação por 30 minutos à 25°C, em tubos de 50 mL para completa hidratação. Em seguida o pH das soluções foram ajustados variando a faixa de pH de 2 a 12 utilizando NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N. As soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 20.000 g (Centrífuga KASVI k14-4000 – Brasil) e o conteúdo de proteína do sobrenadante determinado a partir da reação do corante azul de comassie com as proteínas solúveis. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bel Engennier

Photonic UV M-51 - Itália) no comprimento de onda 595 nm. A proteína albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão (BRADFORD, 1976).

4.8 Processo de extração

4.8.1 Extração fenólica

Uma etapa de extração fenólica foi realizada na farinha de semente de uvaia para melhorar o rendimento proteico do extrato. Inicialmente foi preparada uma dispersão de 50 g da farinha de semente de uvaia em 500 mL de etanol 80% (v/v) e mantida em agitação magnética por 1 hora. A solução foi centrifugada (2000 g por 10 minutos) e o sobrenadante armazenado para dosagem do teor de fenólicos (FARIAS et al., 2020). O precipitado desta solução seguiu para a extração proteica.

4.8.2 Tratamento de ultrassom

As amostras provenientes do precipitado da extração de fenólicos (seção 4.8.1) foram adicionadas de 500 mL de água deionizada (1:10 m/v) e submetidas a sonicação em um processador ultrassônico (ECOsonic QR 750W – Ultronic – Brasil) acoplado com sonda de titânio de 13 mm. A frequência e tempo de processo foram mantidos fixos em 20 kHz por 10 minutos. As amostras foram mantidas em banho de gelo para garantir temperaturas inferiores à 25°C. Foram avaliadas duas potências, sendo 250 (EP250W) e 450 Watts (EP450W). Após a sonicação as amostras seguiram para a extração alcalina.

4.8.3 Extração alcalina e precipitação isoelétrica

Para obtenção dos extratos proteicos de semente de uvaia, foi feita a solubilização proteica alcalina, seguida da precipitação isoelétrica. O resíduo da extração fenólica (4.8.1) foi suspenso em água (1:10 m/v) e separado em três frações, duas delas foram tratadas com ultrassom em diferentes potências (250W e 450W) e uma terceira amostra seguiu direto para a solubilização alcalina (amostra controle) não passando por sonicação. As amostras tiveram seus pHs ajustados para 11,0 com NaOH 1M. Este valor de foi determinado a partir dos resultados da curva de solubilidade feita para FSU (Figura 5). As soluções foram mantidas em agitação magnética por 60 minutos em seguida centrifugadas (2000 g por 10 minutos) (Centrifuga KASVI k14-4000 – Brasil). O sobrenadante rico em proteínas solúveis teve

o pH ajustado para 3 com HCl 1M para precipitação das proteínas em seu ponto isoelétrico (determinado a partir da análise de potencial zeta, seção 4.9.2). A fase de sobrenadante da precipitação foi separada e a pasta proteica do precipitado teve o pH ajustado para 7 (NaOH 1M), e as amostras congeladas a -20 °C e liofilizadas (Liotop – LIOBRAS – BRASIL). O teor de proteína foi medido pelo método de Kjeldahl (fator de conversão de nitrogênio de 6,25).

4.9 Caracterização do extrato proteico de semente de uvaia

4.9.1 Rendimento

Para determinação do rendimento proteico do processo de extração, foram utilizadas as equações 2 (PENG et al., 2021)

$$\text{Rendimento de proteína (\%)} = \frac{\text{Proteína total no extrato proteico}}{\text{Proteína total na FSU}} \times 100 \quad (2)$$

4.9.2 Potencial ζ (zeta)

A medida de potencial ζ foi feita em pH variando de 3 a 10 para a farinha de semente de uvaia e para os extratos proteicos. As amostras foram suspensas em água 0,1% (m/v) e tiveram o pH ajustado com NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N. A leitura de potencial zeta foi realizada com célula DTS 1070 em um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C (PIORNOS et al., 2015).

4.9.3 Raio Hidrodinâmico

A medida de raio hidrodinâmico foi realizada para os extratos proteicos obtidos. Os extratos foram suspensos em solução aquosa de concentração 0,1% (m/v) e tiveram a leitura realizada em cubeta de quartzo em Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C.

4.9.4 FT-iR

Interações química nos extratos proteicos e possíveis alterações químicas no induzidas pelo ultrassom foram determinadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Utilizando um espectrofotômetro FT-iR, (modelo IR Prestige-21 – Shimadzu Kyoto, Japão), 2 mg dos extratos foram combinados com 200

mg de KBr e comprimidos a 80 kN por 10 minutos sob vácuo em *pellets* de 13 mm de diâmetro. Os espectros foram obtidos entre os comprimentos de onda de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.9.5 Dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular dos extratos proteicos foi utilizado para investigar a estrutura secundária das proteínas. Soluções de proteína 0,1% em água Milli-q (pH 7) foram submetidas a um espectropolarímetro (Jasco 810, Jasco Corp., Tóquio, Japão) a 25 °C. Três varreduras foram feitas na faixa espectral de 190 e 260 nm com intervalo de 1 nm sob fluxo de nitrogênio em uma célula de 0,1 cm de comprimento. Os dados coletados foram analisados usando *Dichroweb* (MILES; RAMALLI; WALLACE, 2022). As frações de estruturas α -hélice, β -folha, β -voltas e não ordenadas foram estimadas (DUARTE *et al.*, 2022).

4.9.6 Varredura em espectro UV-Vis

Para identificação da presença de material lignocelulósico foi feito uma varredura em espectrofotômetro UV-Vis (Bel Engennier Photonic UV M-51 - Itália) no comprimento de onda de 200 a 600 nm, com intervalos de 1 nm de soluções de 0,1% (m/v) dos extratos proteicos de semente de uvaia em água e comparados com o espectro da solução (0,1% m/v) de lignina comercial (Lignina álcali – Sigma Aldrich) em pH 7 (RUWOLDT; TANASE-OPEDAL; SYVERUD, 2022).

4.10 Propriedades tecno funcionais do extrato proteico de semente de uvaia

4.10.1 Solubilidade

A curva de solubilidade foi realizada para os extratos proteicos de uvaia em pH variando de 2 a 11 pelo método de Bradford, como descrito na sessão 4.7.

4.10.2 Absorção de óleo e água

A capacidade do extrato proteico de semente de uvaia de reter água e óleo foi avaliada de acordo com o método descrito por Behere e colaboradores (2021) com adaptações. Em microtubos de massa conhecida, 100 mg do extrato proteico foi disperso em 600 μL de água ou óleo. Em seguida homogeneizado em vórtex por 5

vezes em intervalo de 10 minutos. A suspensão foi centrifugada 2000 g por 10 min (CT-6000, Craltech - Brasil) e o sobrenadante foi descartado. O resíduo foi ainda drenado por 20 minutos com os tubos vertidos em papel absorvente (BEHERE; PATIL; RATHOD, 2021). O ganho de peso por unidade de peso da amostra foi relatado como capacidade de absorção de água ou óleo (g/g) conforme equação (3).

$$\text{Absorção de óleo ou água} = \frac{m_1 - m_t - m_0}{m_0} \quad (3)$$

onde, m_1 é a massa do tubo com o *pellet* residual, m_0 é a massa inicial da amostra e m_t é a massa do tubo.

4.11 Atividade antioxidante do extrato proteico de semente de uvaia

A atividade antioxidante do extrato fenólico da semente de uvaia e dos extratos proteicos obtidos foram avaliados pelo método de captura do radical livre ABTS^{•+} e Redução de Ferro (FRAP). A atividade antioxidante do extrato fenólico de semente de uvaia foi avaliada no sobrenadante da extração fenólica, já para os extratos proteicos foram preparadas suspensões em água deionizada 1% (m/v).

4.11.1 ABTS

Para determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS, em 30 µL dos extratos fenólicos das amostras foram adicionados 3,0 mL do radical ABTS, preparado pela reação de persulfato de potássio e 140mM e ABTS 7mM, e a feitura realizada em espectrofotômetro após 6 minutos em comprimento de onda de 734 nm. A curva padrão foi preparada com Trolox como padrão em concentrações variando ente 100 a 2000 µM (RUFINO et al., 2007). Os resultados foram expressos como µM de Trolox equivalente por grama de amostra.

4.11.2 FRAP

A determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro, em uma alíquota de 90 µL de amostra adicionou-se 270 µL de água deionizada e 2,7 mL do reagente FRAP, que foi obtido pela reação de tampão acetato 0,3 M, solução de TPTZ 10 mM e uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos e depois realizado a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 595 nm. Para a curva padrão foi utilizado solução aquosa de

sulfato ferroso variando em concentrações de 500 a 2000 μM (RUFINO et al., 2006). Os resultados foram expressos como μM de sulfato ferroso por grama de amostra.

5 ANÁLISE DE DADOS

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. A significância estatística dos parâmetros foi avaliada pela análise ANOVA e teste Tukey, utilizando o *software* PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) sendo considerada diferença significativa quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussões dos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. A subseção 6.1 apresenta os resultados de caracterização da semente de uvaia, a distribuição do diâmetro médio da partícula e a solubilidade proteica da matéria prima. A subseção 6.2 mostra os dados de rendimento de extração e o teor de amido e proteína presente nos extratos. A subseção 6.3 traz a quantificação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Na subseção 6.4 e 6.5 são apresentados resultados de caracterização físico química dos extratos proteicos, como potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico, FTiR e dicroísmo circular. A subseção 6.6 apresenta os resultados de propriedades funcionais dos extratos proteicos.

Com base nos resultados obtidos, se notou a necessidade de estudos adicionais para entender a composição dos extratos proteicos de semente de uvaia. Foram realizados a identificação de compostos lignocelulósicos por UV vis e teor de cinzas nos extratos. A metodologia e resultados e discussões estão apresentados na subseção 6.7.

6.1 Caracterização da semente de uvaia

A composição centesimal da farinha de semente de uvaia (FSU) utilizada para extração proteica é apresentada na Tabela 3.

Os dados mostram que a FSU é rica em carboidratos (87,67%), sendo que 34,34% correspondem à amido. Apesar de sementes serem comumente serem ricas em óleos, a semente de uvaia apresenta apenas 1,31% de lipídeos. A fração proteica é composta por 10,55% do peso total, sendo maior do que em sementes de outras

frutas da mesma família da uvaia, como a goiaba (7,6%) e pitanga (10,0%) (LIMA *et al.*, 2014; RAIHANA *et al.*, 2015). A composição aproximada foi similar à relatada na literatura para semente de uvaia Farias (2020).

Tabela 3. Composição centesimal da semente de uvaia

Componente	Valor (%)
Umidade	61,46 ± 0,20
Cinzas*	0,58 ± 0,03
Lipídeos*	1,20 ± 0,06
Proteínas*	10,55 ± 0,13
Carboidratos*	87,67 ± 0,10
Amido total*	34,34 ± 1,51

*Valores expressos em massa seca

A granulometria da matéria prima é um fator importante que influencia o rendimento de extração da proteína. A redução de tamanho de partícula aumenta a superfície de contato com o solvente e conseqüentemente, o rendimento de extração, portanto houve a trituração de semente para obter a farinha de semente de uvaia. A distribuição de tamanho de partícula da farinha de semente de uvaia está apresentada na Figura 5.

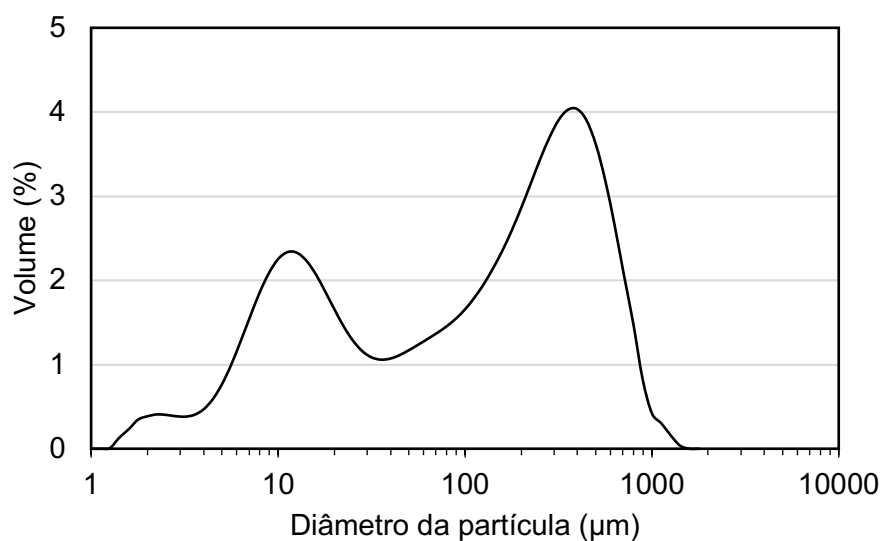


Figura 5. Distribuição do diâmetro médio de partícula da farinha de semente de uvaia utilizada para extração de proteínas.

Observa-se a presença de 3 picos com medianas de 2,24, 11,25 e 399,05 μm , respectivamente. A distribuição foi polidispersa, com diâmetros entre 0,02 μm e 1782,50 μm , e a moda foi de 399,05 μm .

Com a aplicação do ultrassom de alta intensidade, os efeitos cavitacionais agem diretamente sobre as partículas, rompendo células e expondo maior superfície celular ao líquido de extração. Dessa forma pode proporcionar rendimentos de extração mais elevados em comparação com controles não sonicados (CHEMAT et al., 2017; RAHMAN; LAMSAL, 2021).

A curva de solubilidade proteica da farinha de semente de uvaia em diferentes pHs foi essencial para definição do pH alcalino de solubilização proteica e pH de menor solubilidade para precipitação das proteínas. A Figura 6 apresenta a curva de solubilidade proteica da FSU em diferentes valores de pH. A solubilidade proteica da farinha de semente de uvaia foi maior em pH 11, que apresentou aproximadamente 34% de proteínas solúveis.

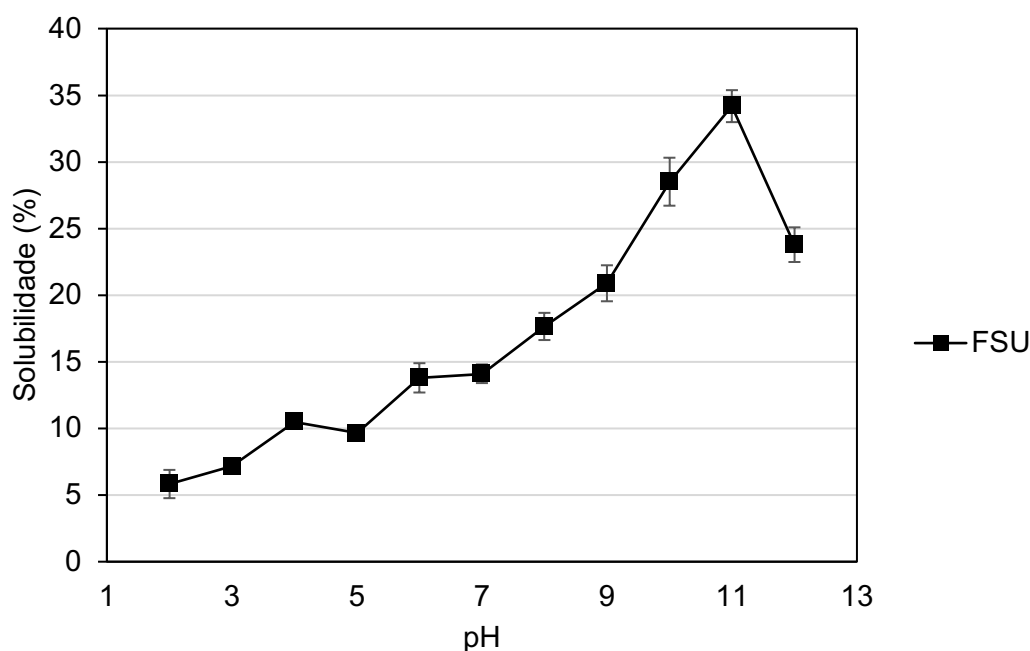


Figura 6. Curva de solubilidade proteica na farinha de semente de uvaia na faixa de pH 2 a 12.

O aumento do pH pode levar à desprotonação de grupos ácidos presentes nas cadeias laterais de aminoácidos, resultando em cargas negativas adicionais e repulsão entre as moléculas de proteína carregadas negativamente. Dessa forma, o

aumento de pH reduz a formação de agregados e favorece a solubilidade das proteínas (SIM et al., 2021).

A menor solubilidade se obteve em pH 2, com 5,8% de proteína solúvel. A curva de solubilidade da farinha de semente de uvaia não teve a característica forma de U para proteínas como reportado em outras fontes (ESPINOSA-MURILLO et al., 2021; NICANOR et al., 2001; RESENDIZ-VAZQUEZ et al., 2017). Mas o resultado se assemelha ao encontrado para farinha de semente de manga, onde teve maior solubilidade em pH 11 e menor em pH 5, porém não houve aumento da solubilidade em pH abaixo de 5 (SAUCEDO et al., 2020).

6.2 Rendimento de extração

O teor de proteína, o rendimento proteico e o rendimento em matéria seca dos extratos de semente de uvaia estão apresentados na Tabela 4. O teor de proteína nos extratos que passaram por tratamento de ultrassom aumentaram significativamente ($p < 0,05$) comparado ao extrato controle com $29,75\% \pm 0,34$. Esse resultado indica que o ultrassom levou a alterações na estrutura da matriz da farinha de semente de uvaia que favoreceu a extração proteica, além de aumentar a pureza proteica pela redução do teor total de amido. O EP250W apresentou teor de proteína ligeiramente menor comparado ao extrato que passou por sonicação com potência de 450W, porém não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre ambos.

Tabela 4. Porcentagem de amido total, proteína bruta e rendimento proteico e de matéria seca dos extratos proteicos de semente de uvaia

Amostra	Amido (%)	Proteína (%)	Rendimento Proteico (%)
EPCT	$1,17^a \pm 0,04$	$29,75^a \pm 0,34$	$15,68^a \pm 0,20$
EP250W	$0,79^b \pm 0,08$	$32,21^b \pm 0,78$	$14,23^b \pm 0,09$
EP450W	$0,86^b \pm 0,02$	$31,75^b \pm 0,83$	$14,37^b \pm 0,10$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey na mesma coluna. EPCT= Extrato proteico controle. EP250W= Extrato proteico tratado com ultrassom 250W de potência. EPCT450W= extrato proteico tratado com ultrassom em 450W de potência.

Além do amido e da proteína, os extratos podem ter uma considerável fração-lignocelulósica que afeta sua composição centesimal e os rendimentos em matéria seca. O trabalho de Gadalkar e Rathod (2020) obteve alto rendimento proteico 87%

na extração de proteína de semente de melancia, utilizando ultrassom por 9 minutos, utilizando potência de 90 W (GADALKAR; RATHOD, 2020). Já a otimização de parâmetro feita por Liu e colaboradores (2018) utilizando ultrassom para extração de semente de Wampi, teve rendimento de 15,06%, porém o processo de ultrassom resultou em melhoras nas propriedades funcionais (solubilidade, capacidade de absorção de óleo e água, formação e estabilidade emulsificante) da proteína extraída quando comparada com ao isolado proteico de soja (LIU et al., 2018). Variações em parâmetros no processo de extração como proporção solvente: sólido, potência e tempo podem ser estudados para aumento de rendimento do extrato proteico de semente de uvaia.

6.3 Fenólicos totais e atividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante da farinha de semente de uvaia e dos extratos proteicos foram registrados na Tabela 5. A FSU apresentou alto teor de compostos fenólicos ($584,8 \pm 1,64$ mg AG/ g) com alta capacidade antioxidante pelo método ABTS ($404,15 \pm 0,03$ μ M TE/ g) e por FRAP ($3256,57^a \pm 15,12$ μ M Fe₂SO₄/ g). O teor de fenólicos totais na semente de uvaia encontrados foram maiores do que relatado por Farias e colaboradores (2020), ($237,44 \pm 2,43$ mg AG/ g) e atividade antioxidante muito próxima ($427,86 \pm 1,19$ μ M TE/ g) por ABTS. O mesmo estudo identificou que o maior teor de compostos fenólicos da uvaia está na semente, fração que normalmente é descartada durante o consumo e/ou processamento da fruta.

Tabela 5. Fenólicos totais e atividade antioxidante da farinha de semente de uvaia e dos extratos proteicos

Amostra	Fenólicos totais (mg AG/ g)	ABTS (μ M TE/ g)	FRAP (μ M Fe ₂ SO ₄ / g)
FSU	$584,80^a \pm 1,64$	$404,15^a \pm 0,03$	$3256,57^a \pm 15,12$
EPCT	$72,31^b \pm 2,34$	$127,15^b \pm 13,23$	$2408,41^b \pm 8,09$
EP250W	$64,02^c \pm 2,51$	$186,39^c \pm 7,64$	$2053,85^b \pm 27,26$
EP450W	$69,87^d \pm 0,97$	$136,71^b \pm 16,07$	$2198,13^b \pm 27,23$

Os dados correspondem a média de triplicata $\pm$ o desvio padrão. Os dados de fenólicos totais são expressos em mg de Ácido Gálico Equivalente, ABTS são expressos em μ M de Trolox equivalente

e FRAP são expressos μM de sulfato ferroso por grama de matéria seca. As letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey na mesma coluna.

Os extratos obtiveram redução de até 90% de compostos fenólicos em relação à FSU. Apesar haver uma etapa de extração fenólica prévia à extração proteica, com o intuito de aumentar o rendimento de proteínas e melhorar propriedades funcionais, os extratos proteicos tiveram ainda assim teores consideráveis de fenólicos totais. Observa-se também que os extratos proteicos que tiveram pré-tratamento de ultrassom apresentaram menor teor de fenólicos, comparados ao controle (EPCT), indicando que o processo de sonicação contribuiu com a extração fenólica prévia à extração proteica.

Estudos demonstram que compostos fenólicos podem interagir com proteínas. Os fenólicos são excelentes doadores de hidrogênio que formam ligações de hidrogênio com grupos carboxilas das proteínas e podem levar a alterações nas propriedades físico-químicas de proteínas, como solubilidade, estabilidade térmica e digestibilidade (CZUBINSKI; DWIECKI, 2017; OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013), porém é elevado o número de fatores que influenciam e promovem a formação de complexos entre proteínas e compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são bioativos relacionados a diversos efeitos benéficos à saúde. Sua ação antioxidante, tem mostrado efeitos positivos no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, ação antitrombótica e anti carcinogênica (NARDINI, 2022; OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). Os extratos proteicos de semente de uvaia tiveram alta atividade antioxidante, tanto pelo método de ABTS como pelo método de FRAP, não foram encontrados dados na literatura de atividade antioxidante de extrato proteico de semente de frutas até o momento.

6.4 Potencial Zeta e Diâmetro hidrodinâmico

A medida de potencial zeta proporciona a compreensão da carga superficial de macromoléculas assumindo uma relevância tecnológica significativa, pois fornece informações cruciais sobre o equilíbrio das interações entre proteínas ou entre proteínas e solvente em diferentes condições (GALVES et al., 2019). Diversos fatores, tais como temperatura, força iônica e pH e a composição aminoacídica podem influenciar a carga superficial das proteínas.

Quanto mais o potencial zeta se afasta de zero mV, maior será a interação da macromolécula com o solvente devido à intensa repulsão eletrostática intra e intermolecular. Em contraste, quando a carga se aproxima de zero, a interação eletrostática é desfavorecida (MALHOTRA; COUPLAND, 2004) e os colóides tendem à agregação.

A carga superficial da dispersão dos extratos proteicos e da farinha de semente foi avaliada em uma faixa de pH de 3 a 10, e os dados são apresentados na Figura 7.

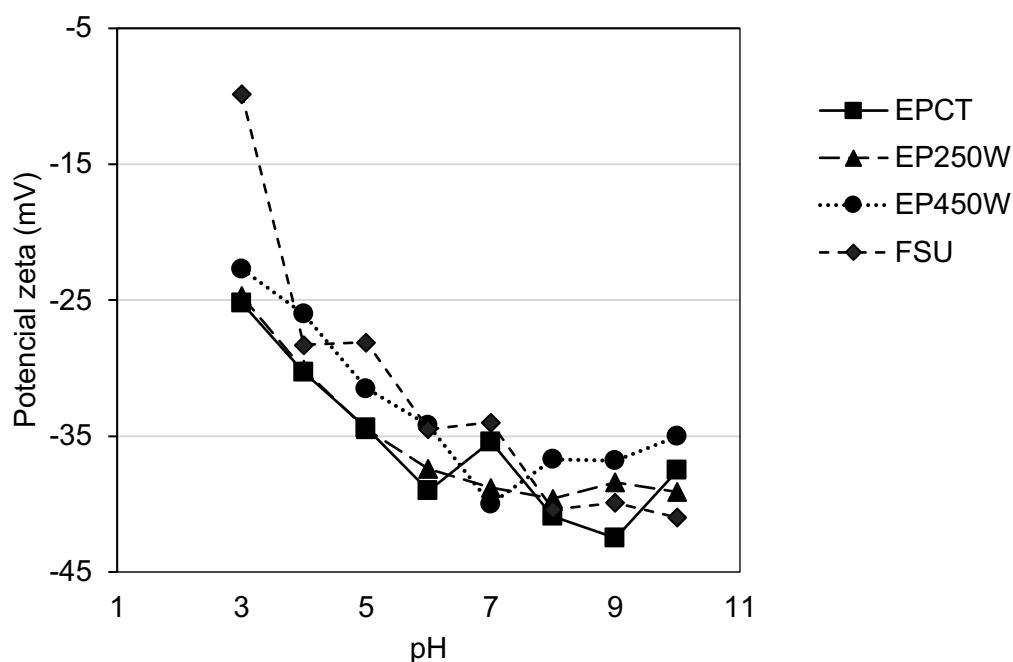


Figura 7. Potencial zeta da farinha de semente de uvaia e dos extratos proteicos de uvaia

O potencial Zeta das soluções de proteína e da farinha de semente de uvaia apresentaram valores negativos variando de -9,83 a -41,0 mV para FSU e para os extratos proteicos, variaram de -22,7 a -39,10 mV em toda a faixa de pH e não foram observados valores próximos à neutralidade supostamente relacionados ao ponto isoelétrico das proteínas, onde a carga total é nula. Esse resultado sugere que os demais componentes dos extratos, como possíveis carboidratos, e sais possam ter influenciado na leitura de potencial zeta, devido à alteração da força iônica do meio.

O potencial zeta dos extratos proteicos e da FSU não se aproximou da neutralidade na faixa de pH estudada, assim como também não se observou solubilidade próxima de zero em toda faixa de pH. Indicando que mesmo em pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína, a influência da matriz e outros componentes

presentes nos extratos podem aumentar a solubilidade do extrato e induzir cargas negativas em baixos valores de pH.

O diâmetro hidrodinâmico não é uma medida física direta do tamanho real da partícula, mas sim uma o tamanho que a partícula aparenta ter em um meio fluido, levando em consideração as interações com as moléculas do fluido, ou seja, a camada de solvatação (KARMAKAR, 2019). O conceito é frequentemente utilizado em teorias que descrevem o movimento browniano de partículas, sedimentação, difusão, e outros fenômenos relacionados ao transporte de partículas em meios fluidos (LIANG et al., 2007).

As medidas experimentais de diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão dos extratos proteicos obtidos são apresentadas na Figura 8. É notável que o tratamento de ultrassom aumentou o diâmetro hidrodinâmico das partículas dos extratos proteicos de semente de uvaia em suspensão, EP250W apresentou maior diâmetro hidrodinâmico, porém não difere estatisticamente de EP450W ($p < 5\%$). O efeito de cavitação do ultrassom pode alterar as propriedades superficiais das partículas, incluindo carga superficial e favorecendo interação proteína- proteína ou proteína e outros compostos da matriz. Mudanças nessas propriedades podem afetar as interações entre as partículas, modificando seu comportamento hidrodinâmico.

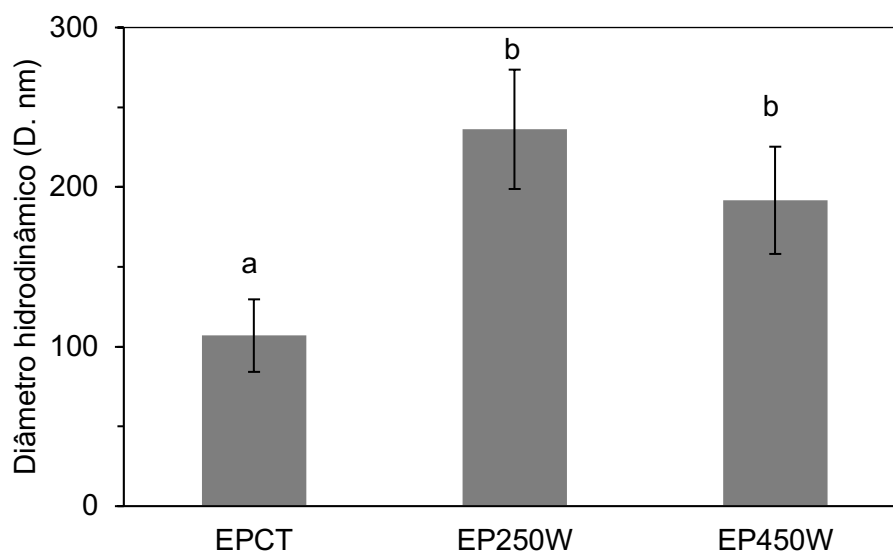


Figura 8. Diâmetro hidrodinâmico dos extratos proteicos de semente de uvaia em suspensão aquosa. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 5\%$).

6.5 FTiR e dicroísmo circular

A radiação infravermelha quando absorvida por uma molécula orgânica, converte-se em energia de vibração molecular. O espectro reflete o movimento vibracional em diferentes comprimentos de onda que costuma aparecer em forma de picos e pode ser utilizada para estudar efeito dos tratamentos na estrutura e nos grupos funcionais da amostra (SILVERSTEIN et al., 2014).

A Figura 9 mostra o espectro de FTIR dos extratos proteicos de semente de uvaia. O pico próximo a região do comprimento de onda em 1600 cm^{-1} corresponde a banda amida I, que resulta das vibrações de estiramento C-N das ligações peptídicas. A região de 1540 cm^{-1} é relacionada à banda amida II, resultantes da vibração de flexão N-H e vibração de alongamento C-N. Na região de 1240 cm^{-1} são observadas vibrações de alongamento C-N e vibração de flexão N-H e são relacionadas à amida III (SILVERSTEIN et al., 2014). Acredita-se que o pico próximo a 3300 cm^{-1} também seja correspondente a vibração de flexão NH de amins e o pico próximo a 1400 cm^{-1} esteja associado a COO^- da cadeia lateral da proteína (SILVERSTEIN et al., 2014). O pico de transmitância próximo a 2.900 cm^{-1} refere-se ao estiramento dos grupos alifáticos $-\text{CH}_2/-\text{CH}_3$ da proteína.

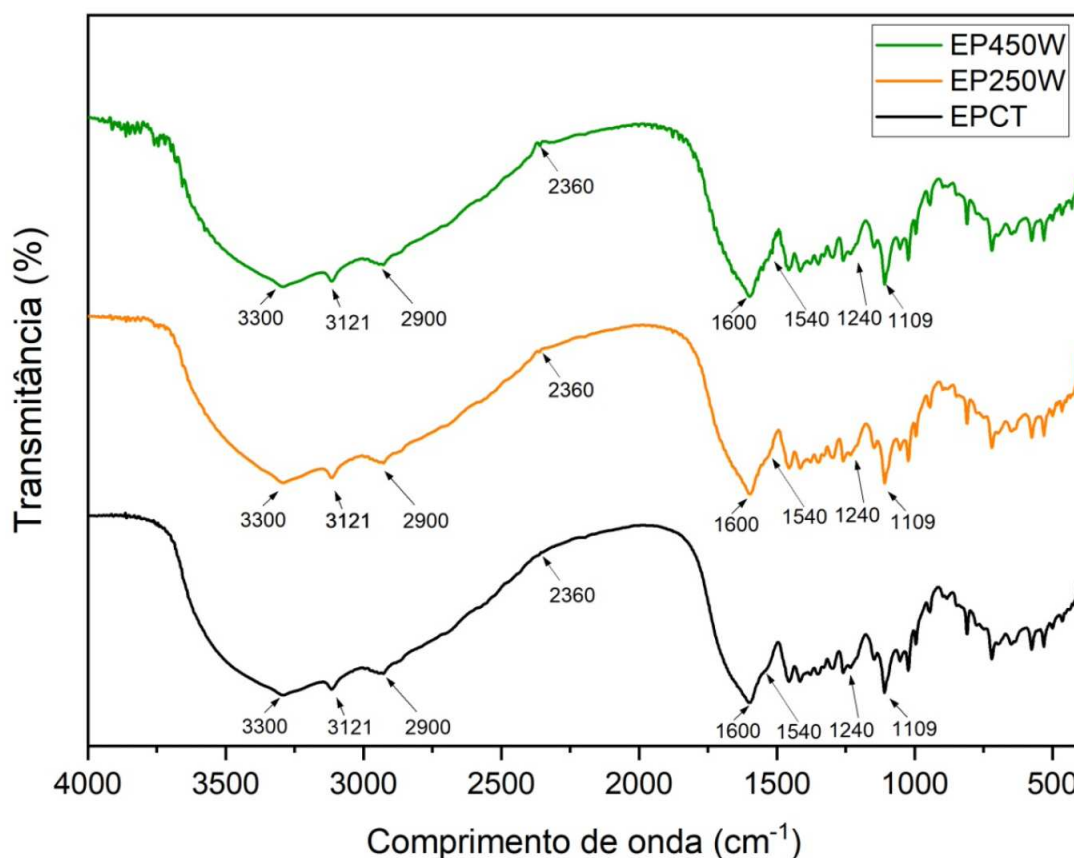


Figura 9. Espectro de FTiR dos extratos proteicos de semente de uvaia

O grupo fenólico é um excelente doador de hidrogênio que formam ligações de hidrogênio com o grupo carboxila da proteína (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). As ligações de hidrogênio intermoleculares aparecem em comprimentos de onda na região entre 3550 a 3200 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2014), a banda de 3444 cm^{-1} está relacionada com possíveis interações de hidrogênio entre fenólico e proteína (SANTOS et al., 2022).

A faixa de comprimento de onda de 900 a 1200 cm^{-1} é atribuída a carboidratos (SILVERSTEIN et al., 2014) e podemos observar um pico acentuado em 1109 que pode estar relacionado a ligações de possíveis carboidratos.

É possível observar que com o aumento da potência de ultrassom aparece ruídos em regiões do espectro. Também uma alteração da região de 2360 cm^{-1} de ligação química não identificada.

Modificações nas estruturas de proteínas podem ser úteis na compreensão da variação nas propriedades funcionais dos extratos proteicos de semente de uvaia. A análise de dicroísmo circular permite conhecer as proporções de estruturas secundárias pela absorção da rotação de luz polarizada por espectroscopia.

As frações de estruturas secundárias dos extratos proteicos de semente de uvaia foram medidas por técnica de dicroísmo circular e apresentadas na Tabela 6. A estrutura de β Folha foi a conformação dominante em todos os tratamentos, seguida por estruturas desordenadas. Observa-se que as amostras que passaram por pré-tratamento de ultrassom tiveram redução na composição de estruturas β Folha e α -Helix, e aumentou a conformação de estruturas β -voltas.

Tabela 6. Composição de estruturas secundárias das proteínas (porcentagem) nos extratos proteicos de semente de uvaia por dicroísmo circular na região UV (190-260 nm).

	α -Helix	β -Folha	β -Voltas	Desordenadas
EPCT	5,9	43,3	15,6	30,9
EP250W	1,7	36,2	29,2	30,5
EP450W	1,8	35,8	29,4	30,7

A diminuição de estruturas desordenadas e aumento de β Voltas foram observadas na proteína de semente de melão extraída assistida por ultrassom (NAIK et al., 2022). Em sementes de guamuchil, o tratamento de ultrassom após extração alcalina da proteína reduz a estrutura α -Helix, e aumentou as estruturas β Voltas e β Folha e apresentaram melhora em propriedades funcionais como solubilidade e capacidade de absorção de óleo (THALÍA FLORES-JIMÉNEZ et al., 2022).

6.6 Propriedades funcionais

As propriedades funcionais dos extratos proteicos de semente de uvaia, tratados ou não com ultrassom foram avaliados quanto a sua solubilidade em variações de pH 2-11 e a capacidade de absorção de óleo e água.

6.6.1 Solubilidade da proteína

A solubilidade dos extratos proteicos medidas entre pH de 2 a 11 são apresentadas na Figura 10. A solubilidade dos extratos proteicos variou entre 12 e 34% na faixa de pH entre 2 e 11.

As solubilidades mais baixas ocorreram em pH 2,0 enquanto as solubilidades máximas foram observadas no valor de pH de 11 em todas as amostras. Apesar de baixa, a solubilidade não foi nula em nenhum valor de pH sugerindo que outros compostos presentes na matriz podem ter aumentado a solubilidade proteica inclusive em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico da proteína. O extrato EP450W teve uma redução na solubilidade em valores de pH alcalinos comparados à amostra EPCT e EP250W. A sonicação pode afetar a solubilidade proteica devido a mudanças na estrutura da proteína (MALIK; SHARMA; SAINI, 2017). Apesar da composição de estruturas secundárias das proteínas de EP250W e EP450W serem semelhantes em pH 7 (Tabela 6) é possível que haja maior exposição em EP450W de grupos hidrofóbicos do que nas demais amostras.

O EP250W teve maior solubilidade em toda faixa de pH, principalmente em valores de pH próximos à neutralidade e em pH 11 (Figura 10). O contrário ocorreu em EP450W, que apresentou redução da solubilidade em toda faixa de pH estudada quando comparada ao tratamento controle.

A melhora ou redução na solubilidade da proteína tratada com ultrassom pode ser atribuída à mudança da conformação da proteína. O trabalho de Flores-Jiménez

e Colaboradores (2022) mostrou que o tratamento de ultrassom a 200W na proteína de semente de guamuchil pode aumentar a solubilidade em 18%, mas potências mais altas (600W), não induzem aumento significativo comparado ao controle.

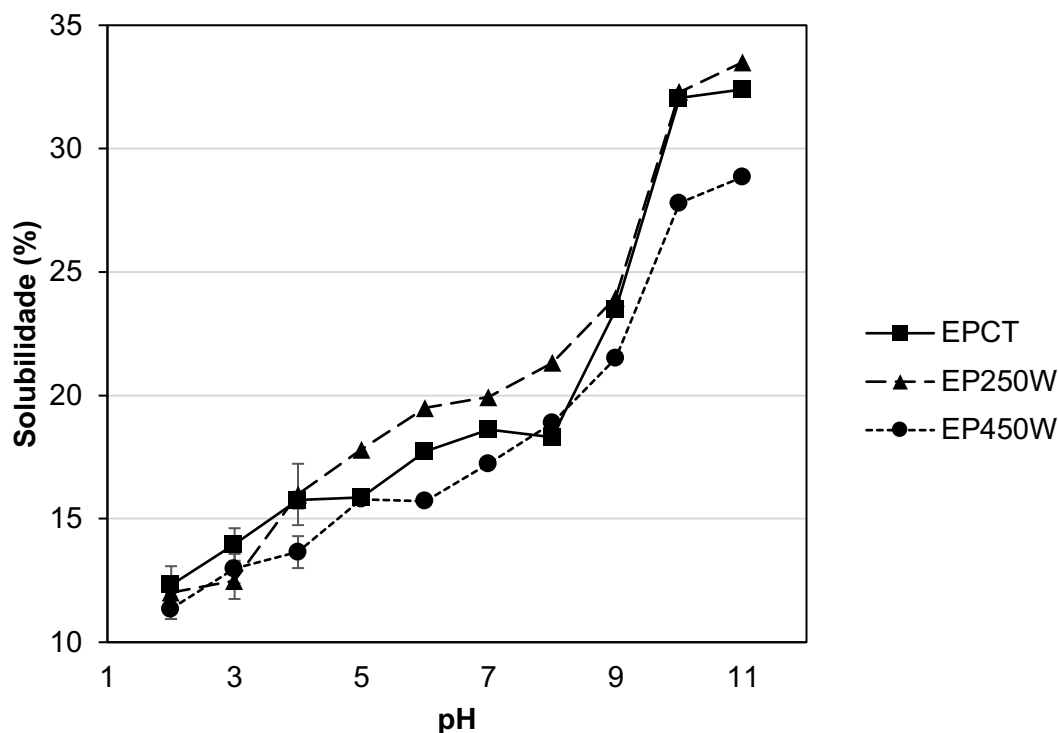


Figura 10. Curva de solubilidade dos extratos proteicos de semente de uvaia, tratados ou não com ultrassom.

O aumento de solubilidade devido à influência do ultrassom pode ser associado a alterações nas interações não covalentes, por exemplo, forças de Van-der-Waals, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio (NAIK et al., 2022). O ultrassom rompe interações eletrostáticas entre NH_2^- e COO^- livres na superfície da proteína, levando a mudanças estruturais nas proteínas, que se manifestam através da exposição de grupos hidrofílicos de aminoácidos à água (FLORES-JIMÉNEZ et al., 2022). Este fenômeno leva à dispersão da proteína e, portanto, melhora da solubilidade.

6.6.2 Capacidade de absorção de óleo e água

A capacidade de retenção de óleo e água de extratos proteicos tem papel importante na melhoria de características em alimentos, como suculência, textura, estabilidade e viscosidade. A capacidade de absorção de óleo e água dos extratos

proteicos de semente de uvaia foram medidos por gravimetria, e os resultados expressos na Figura 11.

Os extratos que tiveram tratamento de ultrassom tiveram redução na capacidade de absorção de água comparados a EPCT, porém não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si.

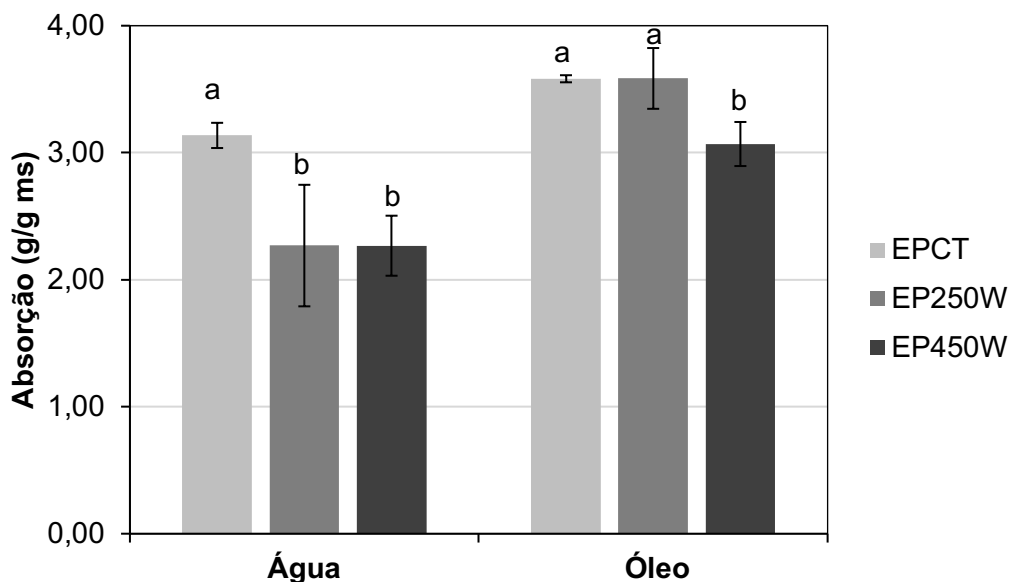


Figura 11. Capacidade de absorção de óleo e água dos extratos proteicos de semente de uvaia em grama de óleo ou água por grama de matéria seca (ms). As barras de erro representam os desvios padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Para absorção de óleo, os extratos EPCT e EP250W não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). A potência mais alta de ultrassom reduziu a capacidade de retenção de óleo para o EP450W. Para todos os extratos, houve maior capacidade de absorção de óleo do que para os mesmos tratamentos em água. O mesmo foi observado em proteína de semente de Jaca tratada por ultrassom, o tratamento de ultrassom aumento a capacidade de absorção de óleo, e diminuiu a capacidade de absorção de água, mas o tratamento intenso de 600W de potência reduziu a capacidade de absorção de óleo comprado ao tratamento de 200 e 400W (ULLOA et al., 2017).

A mudança estrutural vista pela análise de dicroísmo circular sugere que cavitação ultrassônica expôs mais grupos hidrofóbicos que melhoraram a retenção física do óleo pelas moléculas de proteína, o que eventualmente diminui a capacidade de absorção de água e não alterou a capacidade de retenção de óleo (MALIK;

SHARMA; SAINI, 2017). Este efeito pode ocorrer devido à presença variável de grupos hidrofóbicos nas superfícies das moléculas de proteínas.

As propriedades funcionais dependem das características inerentes da proteína, fonte, intensidade e frequência do ultrassom, bem como do pH, temperatura, força iônica, tempo e todas as outras variáveis que afetam as propriedades físico-químicas de proteínas. Os resultados obtidos indicam que a proteína de semente de uvaia pode ser utilizada na retenção de compostos lipídicos em formulações alimentícias.

6.7 Identificação de material lignocelulósico e quantificação de cinzas

Os resultados de pureza, rendimento e a baixa solubilidade dos extratos proteicos, sugerem a possível presença de material lignocelulósico, que são característicos de alta hidrofobicidade. Outra possibilidade é a presença de sais formados no processo de ajuste de pH durante e após a extração, refletindo no teor de cinzas dos extratos. A hidrofobicidade proteica pode influenciar na sua solubilidade (COSTA et al., 2011). Da mesma forma que as proteínas, a lignina também possui solubilidade em pH alcalino, e pode ser solubilizada juntamente com proteínas durante o processo de extração (ERDOCIA et al., 2021).

A estrutura da lignina apresenta anéis aromáticos com forte absorção na região UV. O espectro UV-Vis dos extratos proteicos e da lignina padrão estão apresentados na Figura 12. Uma banda de forte absorbância na região de 280 nm é o resultado de um anel benzênico substituído por grupos hidroxilas. Em soluções alcalinas, os grupos hidroxila fenólicos são ionizados e a absorção muda para comprimentos de onda mais longos e intensidades mais altas (STARK; YELLE; AGARWAL, 2016). Como os extratos proteicos e a lignina usada como referência foram originariamente extraídas em meio alcali, é possível observar bandas mais largas em comprimento de onda até 400 nm. Esses resultados indicam a presença de material lignocelulósico nos extratos proteicos de semente de uvaia.

A presença de materiais lignocelulósicos também transparece nos espectros de FTiR (Figura 6). As bandas em 1600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} são características de vibração de estruturas aromáticas de lignina (OUYANG et al., 2009), mas também estão relacionadas a amida I em proteínas.

O trabalho de Yan e colaboradores (2010) mostrou que a lignina tem potencial zeta negativo para toda faixa de pH (1 a 12), variando de -27 a -40 mV à medida que se aumenta o pH da solução aquosa de lignina. Ou seja, a medida de potencial zeta da proteína dos extratos proteicos de semente de uvaia pode ter sido influenciada pela presença de material lignocelulósico.

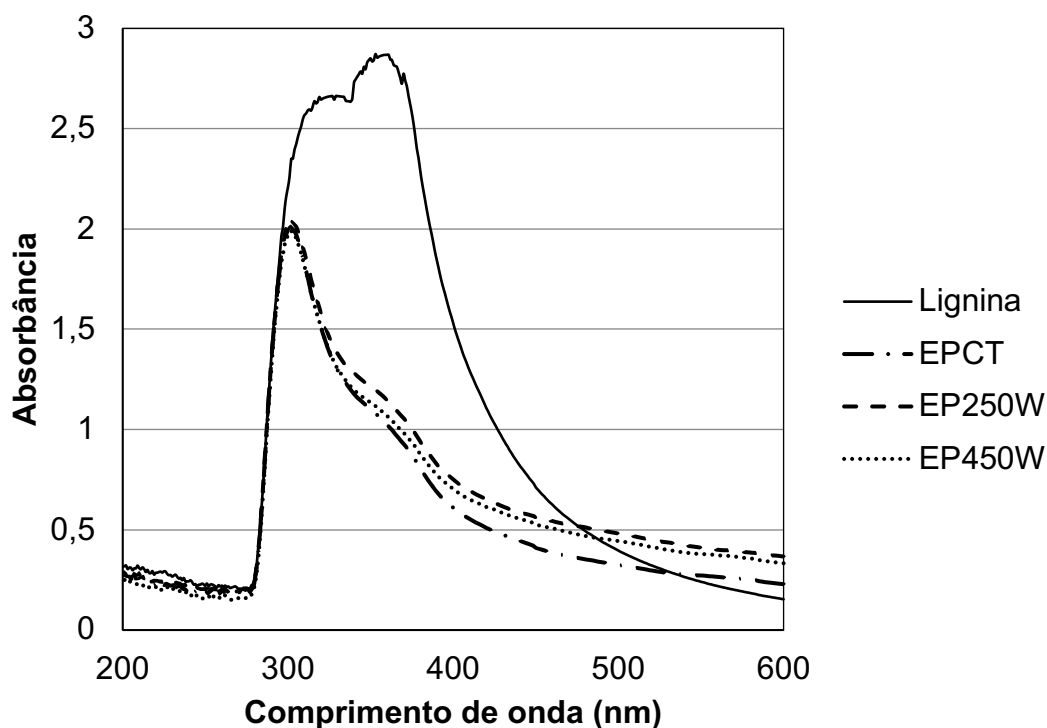


Figura 12. Espectro UV-Vis dos extratos proteicos de semente de uvaia e lignina comercial.

Outro fator que pode influenciar fortemente a solubilidade e propriedades funcionais dos extratos é a força iônica das amostras, relacionada ao teor de cinzas dos extratos apresentado na Tabela 7. Os produtos da reação de neutralização de um ácido (HCl 1M) por uma base (NaOH 1M) são sais (NaCl) e água. É possível observar que houve a formação de sais durante o processo de extração proteica. Os extratos proteicos apresentaram teor de até 12,6% de cinzas enquanto a FSU apresenta um teor de cinzas de 0,58% (Tabela 1).

Tabela 7. Teor de cinzas em extratos proteicos de semente de uvaia

EPCT	EP250W	EP450W
------	--------	--------

Cinzas (%)	8,67 ± 0,84	12,60 ± 0,50	5,61 ± 0,61
-------------------	-------------	--------------	-------------

Os dados representam a média de triplicata ± o desvio padrão.

A presença de sais nos extratos pode influenciar na leitura de potencial zeta das partículas do extrato e em sua solubilidade, devido ao aumento da força iônica (KARMAKAR, 2019). Consequentemente, dificultar a identificação do ponto isoelétrico da proteína pelo potencial zeta e solubilidade, como ocorreu neste trabalho.

7 CONCLUSÃO

Foi possível obter extrato proteico de semente de uvaia e avaliar suas propriedades físico-químicas e funcionalidades, bem como avaliar a influência da potência de ultrassom sobre sua estrutura e funcionalidade. A maior solubilidade proteica da FSU foi obtida em pH 11 e o pH 3 foi escolhido para recuperação de proteínas por precipitação, por apresentar baixa solubilidade. O ultrassom com potência de 250W foi mais eficiente na extração proteica. Apesar do processo de pré-extração fenólica ter reduzido em até 90% o teor de fenólicos das amostras em relação à FSU, os extratos proteicos apresentaram alto teor de fenólicos e boa capacidade antioxidante. Os extratos que tiveram pré-tratamento por ultrassom tiveram ainda mais redução do teor fenólico. Os extratos apresentaram baixa solubilidade proteica e medida de potencial zeta negativo em toda faixa de pH estudada, possivelmente devido à presença de material lignocelulósico identificado pela análise de UV-Vis e ao teor de cinzas. A estrutura secundária predominante nas proteínas de semente de uvaia são β - Folhas, e a sonicação como pré-tratamento mostrou que pode reduzir a composição dessas estruturas e aumentar estruturas β – Voltas. Quanto às propriedades funcionais testadas, as proteínas de semente de uvaia apresentaram solubilidade variando de 12 a 34% não sendo influenciada pelo tratamento de ultrassom. Porém as amostras sonicadas tiveram menor retenção de água. Por outro lado, amostras sonicadas com elevada potência (450W) apresentaram redução na capacidade de absorção de óleo. Por fim, considera-se que o extrato proteico de semente de uvaia possui uma matriz complexa com outros compostos que atuam em sinergia e que aparentam ter alta hidrofobicidade. A produção e caracterização de extratos proteicos a partir da semente da fruta abre novas perspectivas de aplicação e aproveitamento do resíduo, valorizando a cadeia produtiva da Uvaia e patrimônio genético nacional, podendo estimular o desenvolvimento da agricultura sustentável, preservação e exploração consciente da biodiversidade brasileira.

8 TRABALHOS FUTUROS

Apesar dos avanços significativos alcançados neste estudo, ainda existem lacunas importantes a serem exploradas. A limitação inicial de quantidade de matéria prima, e o baixo rendimento de extração impediu a realização das extrações em replicatas, e a execução de outras análises que pudessem contribuir para a discussão deste trabalho.

A caracterização total do extrato, quanto ao teor de lipídios e carboidratos, com quantificação de material lignocelulósico poderia contribuir para entender a composição centesimal dos extratos e os rendimentos de extração obtidos. Tais caracterizações seriam interessantes para otimização do rendimento de extração proteica e poderiam contribuir para o entendimento do comportamento das propriedades funcionais dos extratos.

A composição aminoacídica e avaliação de compostos anti nutricionais, poderíamos dar mais informações sobre o poder nutricional do extrato proteico de semente de uvaia e sua aplicação em produtos alimentícios.

A variação de parâmetros de extração, como temperatura, tempo, proporção sólido:líquido também são pontos a serem explorados para aumentar o teor proteico, rendimento e avaliar as mudanças nas propriedades funcionais dos extratos.

A análise de fluorescência poderia contribuir para identificar a hidrofobicidade superficial da proteína do extrato e relacionar com os dados de solubilidade e absorção de óleo e água.

9 REFERÊNCIAS

AKHARUME, F. U.; ALUKO, R. E.; ADEDEJI, A. A. Modification of plant proteins for improved functionality: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 198–224, 1 jan. 2021.

ALBAKRY, Z. et al. Nutritional Composition and Volatile Compounds of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seed, Fatty Acid Composition and Tocopherols, Polyphenols, and Antioxidant Activity of Its Essential Oil. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 575, 1 jul. 2022.

AMPOFO, J.; NGADI, M. Ultrasound-assisted processing: Science, technology and challenges for the plant-based protein industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 84, p. 105955, 1 mar. 2022.

ASHOK N., A.; SONTAKKE, M. Comparative analysis of extraction methods, proximate composition, and physicochemical and functional properties of fruit seed proteins: A comprehensive review. **eFood**, v. 4, n. 6, 24 dez. 2023.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016. 20th ed. Gaithersburg: AOAC., 2016.**

BEHERE, M.; PATIL, S. S.; RATHOD, V. K. Rapid extraction of watermelon seed proteins using microwave and its functional properties. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 252–259, 2021.

BERNARDINO-NICANOR, A. et al. Guava seed storage protein: Fractionation and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 902–910, out. 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1 ago. 1959.

BYANJU, B. et al. Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea, kidney bean, and soybean. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 712–721, fev. 2020.

CARVALHO, P. E. R. Uvaieira: *Eugenia pyriformis*. Em: **Espécies Arbóreas Brasileiras**. [s.l.] Embrapa Florestas, 2010. v. 4p. 547–553.

CHANDRAN, A. S.; SURI, S.; CHOUDHARY, P. Sustainable plant protein: an up-to-date overview of sources, extraction techniques and utilization. **Sustainable Food Technology**, v. 1, n. 4, p. 466–483, 2023.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 1 jan. 2017.

COSTA, T. G. et al. Lignina e a dormência em sementes de três espécies de leguminosas florestais da Mata Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 18, n. 2, p. 204–209, 2011.

CUI, Q. et al. Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 4, p. 172–176, 1 jul. 2017.

CZUBINSKI, J.; DWIECKI, K. A review of methods used for investigation of protein–phenolic compound interactions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 3, p. 573–585, 29 mar. 2017.

DA SILVA, A. P. G. et al. Chemical composition, nutritional value and bioactive compounds in six uvaia accessions. **Food Chemistry**, v. 294, p. 547–556, 1 out. 2019.

DA SILVA, A. P. G. et al. **Chemical composition, bioactive compounds, and perspectives for the industrial formulation of health products from uvaia (Eugenia pyriformis Cambess – Myrtaceae): A comprehensive review. Journal of Food Composition and Analysis.** Academic Press, 1 jun. 2022.

DACOREGGIO, M. V. et al. A Comprehensive Review of Eugenia Pyriformis Cambess: Reported Bioactivities and Health Effects. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1958226>, v. 39, p. 2477–2491, 2021.

Embrapa bdpa. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

ERDOCIA, X. et al. Lignin extraction and isolation methods. Em: **Lignin-Based Materials for Biomedical Applications.** [s.l.] Elsevier, 2021. p. 61–104.

ESPINOSA-MURILLO, N. D. C. et al. Impact of high-intensity ultrasound on the physicochemical and functional properties of a protein isolate from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. **International Journal of Food Engineering**, v. 17, n. 8, p. 609–618, 1 ago. 2021.

FARIAS, D. DE P. et al. Distribution of nutrients and functional potential in fractions of *Eugenia pyriformis*: An underutilized native Brazilian fruit. **Food Research International**, v. 137, p. 109522, 1 nov. 2020.

FEYZI, S. et al. A comparison of chemical, structural and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein isolates produced using different defatting solvents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 27–35, 1 dez. 2017.

FLORES-JIMÉNEZ, N. T. et al. Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. **Food Research International**, v. 121, p. 947–956, 1 jul. 2019.

GADALKAR, S. M.; RATHOD, V. K. Extraction of watermelon seed proteins with enhanced functional properties using ultrasound. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 133–140, 2020.

GALVES, C. et al. Effect of pH and defatting on the functional attributes of safflower, sunflower, canola, and hemp protein concentrates. **Cereal Chemistry**, v. 96, n. 6, p. 1036–1047, 1 nov. 2019.

GUSTAVO SGANZERLA, W. et al. Nutritional, physicochemical and antimicrobial properties of uvaia pulp (*Eugenia pyriformis* Cambess). **Communications in Plant Sciences**, 2018.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

IBGE. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

JACOMINO, A. P. et al. Uvaia—*Eugenia pyriformis* Cambess. **Exotic Fruits**, p. 435–438, 1 jan. 2018.

KAMAL, H. et al. Impact of cavitation on the structure and functional quality of extracted protein from food sources – An overview. **Food Chemistry**, v. 407, p. 135071, 1 maio 2023.

KARMAKAR, S. Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering: Techniques to Characterize Stability and Surface Charge Distribution of Charged Colloids. Em: **Recent Trends in Materials: Physics and Chemistry**. 28. ed. [s.l: s.n.]. p. 117–159.

LAKEMON, C. M. M. et al. Soy Glycinin: Influence of pH and Ionic Strength on Solubility and Molecular Structure at Ambient Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 1985–1990, 1 jun. 2000.

LIANG, Y. et al. Interaction forces between colloidal particles in liquid: Theory and experiment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 134–135, p. 151–166, out. 2007.

LIU, Y. et al. Ultrasonic-assisted extraction and functional properties of wampee seed protein. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 324–331, 29 nov. 2018.

LOVEDAY, S. M. Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 311–339, 25 mar. 2019.

MALHOTRA, A.; COUPLAND, J. N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 101–108, jan. 2004.

MALIK, M. A.; SHARMA, H. K.; SAINI, C. S. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, p. 511–519, nov. 2017.

MCCLEARY, B. V. et al. Measurement of available carbohydrates, digestible, and resistant starch in food ingredients and products. **Cereal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 114–137, 26 jan. 2020.

NAIK, M. et al. Pulsed ultrasound assisted extraction of protein from defatted Bitter melon seeds (*Momardica charantia* L.) meal: Kinetics and quality measurements. **LWT**, v. 155, p. 112997, fev. 2022.

NARDINI, M. Phenolic Compounds in Food: Characterization and Health Benefits. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 783, 25 jan. 2022.

NICANOR, A. B. et al. Guava seed protein isolate: Functional and nutritional characterization. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 77–90, 2001.

OUYANG, X. et al. Sulfonation of Alkali Lignin and Its Potential Use in Dispersant for Cement. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 1–6, 5 jan. 2009.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954–970, maio 2013.

PENG, Y. et al. Characteristics of Soy Protein Prepared Using an Aqueous Ethanol Washing Process. **Foods** 2021, Vol. 10, Page 2222, v. 10, n. 9, p. 2222, 18 set. 2021.

PIORNOS, J. A. et al. Functional and physicochemical properties of a protein isolate from AluProt-CGNA: A novel protein-rich lupin variety (*Lupinus luteus*). **Food Research International**, v. 76, p. 719–724, 1 out. 2015.

POJIĆ, M.; MIŠAN, A.; TIWARI, B. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 93–104, 1 maio 2018.

RAHMAN, M. M.; LAMSAL, B. P. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1457–1480, 2 mar. 2021.

RESENDIZ-VAZQUEZ, J. A. et al. Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 436–444, jul. 2017.

RODRIGUES, L. M. et al. Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) residue as a source of antioxidants: An approach to ecofriendly extraction. **LWT**, v. 138, p. 110785, 1 mar. 2021.

RUFINO, M. DO S. M.; et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 125, p. 1–4, 2006.

RUFINO, M. DO S. M.; et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 128, p. 1–4, 2007.

RUWOLDT, J.; TANASE-OPEDAL, M.; SYVERUD, K. Ultraviolet Spectrophotometry of Lignin Revisited: Exploring Solvents with Low Harmfulness, Lignin Purity, Hansen Solubility Parameter, and Determination of Phenolic Hydroxyl Groups. **ACS Omega**, v. 7, n. 50, p. 46371–46383, 20 dez. 2022.

SANTOS, M. A. S. et al. Designing covalent sodium caseinate-quercetin complexes to improve emulsifying properties and oxidative stability. **Food Research International**, v. 160, p. 111738, out. 2022.

SAUCEDO, MA. DEL R. et al. Caracterización tecno-funcional de un concentrado proteínico obtenido de la semilla de mango (*Mangifera indica* L. **Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud**, v. 23, p. 120–126, 2020.

SCALON, S. DE P. Q. et al. Sensibilidade à dessecação e ao armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 269–276, mar. 2012.

SGANZERLA, W. G. et al. Geographical discrimination of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 15, p. 6778–6787, 1 dez. 2019.

SGANZERLA, W. G.; DA SILVA, A. P. G. Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess – Myrtaceae): An overview from the origin to recent developments in the food industry – A bibliometric analysis. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 10, p. 100369, 1 dez. 2022.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 8. ed. [s.l.] Wiley, 2014.

SIM, S. Y. J. et al. Plant Proteins for Future Foods: A Roadmap. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1967, 23 ago. 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

STARK, N. M.; YELLE, D. J.; AGARWAL, U. P. Techniques for Characterizing Lignin. Em: **Lignin in Polymer Composites**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 49–66.

TAN, M.; NAWAZ, M. A.; BUCKOW, R. Functional and food application of plant proteins – a review. **Food Reviews International**, v. 39, n. 5, p. 2428–2456, 4 jul. 2023.

THALÍA FLORES-JIMÉNEZ, N. et al. Influence of high-intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of a guamuchil *Pithecellobium dulce* (Roxb.) seed protein isolate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 84, p. 105976, 1 mar. 2022.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105–121, out. 2009.

ULLOA, J. A. et al. Production, physico-chemical and functional characterization of a protein isolate from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. **CYTA–JOURNAL OF FOOD**, v. 15, n. 4, p. 497–507, 2 out. 2017.

URUAKPA, F. O. Gelling behavior of plant proteins and polysaccharides in food systems. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 2, p. 247, 2012.

WANG, Y. et al. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical, interfacial and gel properties of chickpea protein isolate. **LWT**, v. 129, p. 109563, 1 jul. 2020.

WATFORD, M.; WU, G. Protein. **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 651–653, 1 set. 2018.

WEN, L. et al. Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 5, p. 1575–1585, 1 out. 2021.

XUE, F. et al. Effects of high-intensity ultrasound treatment on functional properties of plum (*Pruni domesticae* semen) seed protein isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5690–5699, 1 dez. 2018.

YAN, M. et al. Influence of pH on the behavior of lignosulfonate macromolecules in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 371, n. 1–3, p. 50–58, nov. 2010.

ZHU, Z. et al. Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. **Food Research International**, v. 106, p. 853–861, 1 abr. 2018.

APÊNDICE A – Resultados Complementares

1. Quantificação de açúcares solúveis

Os açúcares solúveis na farinha de semente de uvaia foram identificados e quantificados por Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Os açúcares solúveis foram extraídos quatro vezes a partir de 10 mg (massa seca) de amostra com 1,5 mL de etanol 80% (v/v) por 20 minutos a 80°C. O extrato foi concentrado a vácuo e ressuspendido em 1 mL de água e 1m de clorofórmio. Os açúcares solúveis foram analisados em sistema Dionex® (ICS 5000) acoplado com coluna CarboPac PA1 e foram eluidos isocraticamente com 150 µM de hidróxido de sódio. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Quantificação de açúcares solúveis em semente de uvaia.

	Glicose (µg/mg)	Frutose (µg/mg)	Sacarose (µg/mg)	Rafinose (µg/mg)
Semente de uvaia	0,12 ± 0,17	1,76 ± 1,15	0,44 ± 0,98	ND*

Os dados representam média de quintuplicata em µg de açúcar por mg de matéria seca.
*ND= Não detectado.

O teor total de açúcares solúveis presente da semente de uvaia foi de 2,32 µg/mg para as frações estudadas (glicose, frutose, sacarose e rafinose), sendo frutose a fração de maior concentração com 1,76 µg/mg e não foi detectado presença de rafinose. Os valores quantificados foram muito inferiores aos reportados por Farias e colaboradores (2020) de 23,35 (mg/g) para os mesmos oligossacarídeos, com sacarose sendo a maior fração (13,52 mg/g).

2. Eletroforese

A eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feita para identificar o tamanho molecular das proteínas dos extratos proteicos de semente de uvaia em condições redutoras e não redutoras de acordo com a metodologia proposta por Laemmli (1970). Foi realizada em um sistema de eletroforese Mini-Protein Tetra (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA) em um gel de separação a 12% e um gel de empacotamento a 5%. O teor de proteína de todas as amostras foi de 2 mg/mL. Também foram testados com amostras de 5 mg/mL de teor proteico em mesmo gel. As amostras foram preparadas em tampão de amostra em condições não redutoras (3,55 mL de água milli-q, 1,25 mL de 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2,5 mL de glicerol 2,0 mL SDS 10% (m/v) e 0,2 mL de azul de bromofenol) e redutoras (tampão de amostras com 50 μ L de β -mercaptoentanol) e incubada a 95°C por 5 minutos.

O padrão de proteína (10–250 kD, número do produto 161-0373 Bio-Rad) e as amostras foram carregadas em gel em volume igual (10 μ L) e submetidas à eletroforese a uma voltagem constante de 75 V por 120 minutos usando tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 191 mM e 1 g de SDS por litro). A final da corrida, os géis foram corados com azul de Coomassie por 12h e descorados com etanol: ácido acético: água deionizada na proporção 10:5:85 (p:v) até os géis ficarem límpidos e transparentes.

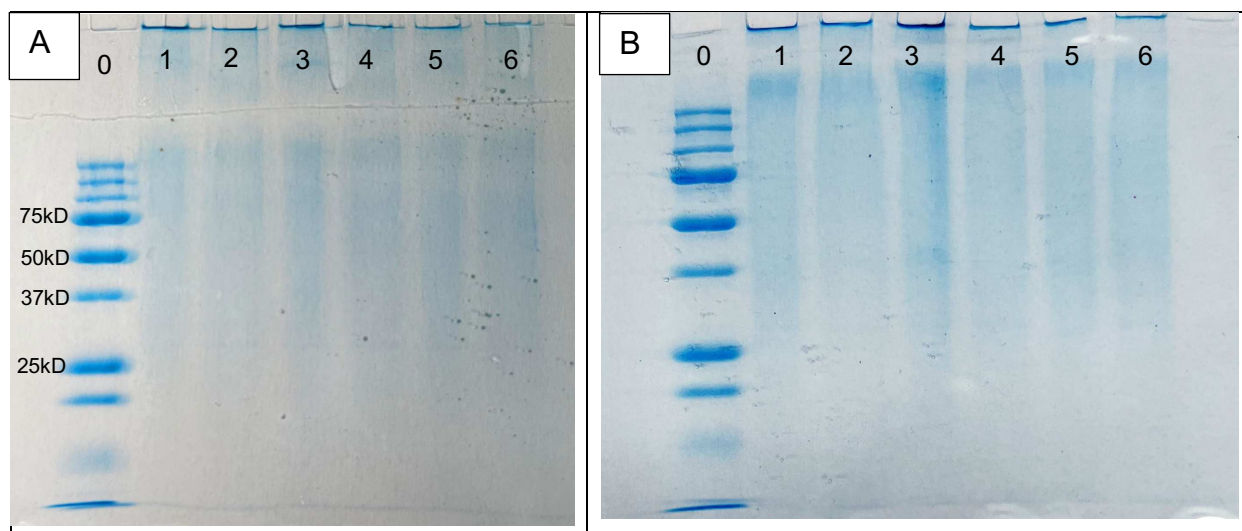


Figura 13. Eletroforese em condições redutoras e não redutoras dos extratos proteicos de uvaia. (A) Amostras 2 mg/mL. (B) Amostras 5 mg/mL. 0= Padrão de peso molecular. 1= ECPT, 2= EPCT - Redutor, 3= EP250W, 4= EP250W – Redutor, 5= EP450W, 6= EP450W – Redutor.

Os géis após a corrida de eletroforese não tiveram bandas marcadas como esperado. É possível ver que em ambas as concentrações de proteínas nos géis a amostra ficou retida no início do poço de amostra. Isso indica que a amostra possui alto peso molecular, não sendo possível se quer correr pelo gel de empacotamento que possui menor concentração de poliacrilamida (5%). Pelo extrato não ser altamente puro em proteína e conter uma matriz complexa, outros compostos podem estar associados à proteína e impedindo a corrida pelo gel. Outras concentrações nas formulações do gel de poliacrilamida e preparo de amostra podem ser testadas.

3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A Calorimetria diferencial de varredura (DSC) é usada para determinar a temperatura e o fluxo de calor associados às transições de materiais em função do tempo e da temperatura. A propriedade térmica dos extratos proteicos de semente de uvaia foi feita em um DSC TA Instruments Q-2000 (TA Instruments New Castle, DE, EUA). Cerca de 10mg do pó seco dos extratos proteicos foram encapsulados em um recipiente de alumínio e junto a um recipiente de alumínio vazio, usado como referência, foi escaneado a uma taxa de 10 °C por minuto de 20 a 100 °C em ambiente com vazão de nitrogênio a 100 mL/min. Os termogramas de registro de escaneamento de temperatura foram obtidos pelo software TA Universal Analysis e apresentados na Figura 14.

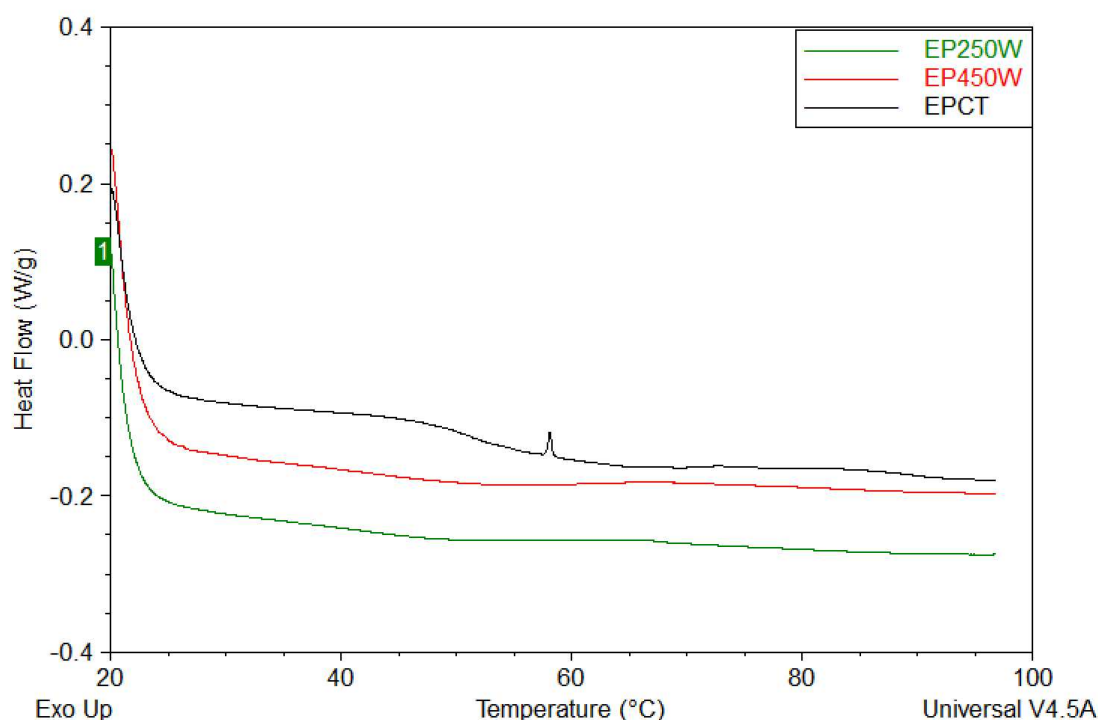


Figura 14. Termograma de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) dos extratos proteicos de semente de uvaia.

Quando a estrutura da proteína é alterada irreversivelmente por temperatura, é chamada de desnaturação térmica, e o resultado esperado por DSC é um pico endotérmico. Para proteínas é esperado que haja eventos térmicos próximo a faixa de temperatura de 60 a 90 °C. Não foram observados picos acentuados nas regiões esperadas. A complexa matriz do extrato pode ter influenciado no aumento da temperatura de estabilidade térmica da proteína ou a pureza proteica do extrato não

foi suficiente para ser detectada pelo equipamento utilizado, também não foi possível testar temperaturas mais altas devido a sensibilidade do equipamento utilizado.